U owiec kontrolą cytogenetyczną proponuje się objąć przede wszystkim osobniki pochodzące z ciąż bliźniaczych i mnogich oraz tryki przeznaczone do wykorzystania w rozrodzie (przy zastosowaniu inseminacji).

Jeżeli chodzi o konie, to do analiz cytogenetycznych powinny być kierowane przede wszystkim młode klacze, które planuje się wykorzystać w dalszej hodowli, a także wszystkie osobniki mające problemy z rozrodem.

Zakład Immuno- i Cytogenetyki Instytutu Zootechniki posiada odpowiednie wyposażenie i kadrę naukową o wysokich kwalifikacjach, upoważniających do prowadzenia wszelkich analiz cytogenetycznych u zwierząt gospodarskich.

Seksowanie nasienia buhajów

Michał Bochenek, Maria Skrzyszowska, Zdzisław Smorąg

Genetyczna płeć potomstwa ssaków determinowana jest w trakcie zapłodnienia. Samica, posiadająca chromosomy płciowe XX, wytwarza oocyty z chromosomem X. Samiec, posiadający komplet chromosomów płciowych XY, produkuje plemniki zawierające chromosom X lub Y. Zatem to właśnie od rodzaju plemnika zależy płeć przyszłego ssaka. Podstawy do teorii o chromosomalnej determinacji płci stworzono w latach 1910-1916, głównie dzięki pracom Morgana [13]. W pierwszych badaniach, wykonanych na muszkach *Drosophila* stwierdzono, że osobniki z pojedynczym chromosomem X (XO, XY) są samcami, natomiast obecność dwóch lub więcej chromosomów X (XX, XXX, XXY) determinuje płeć żeńską [32]. Początkowo sądzono, że chromosom Y ssaków nie posiada informacji genetycznej, z wyjątkiem pewnych fragmentów odpowiedzialnych za płodność samców [30]. Dopiero dzięki technikom kariotypowania chromosomów, opracowanych w latach 60-tych, okazało się, że rozwój jąder ssaków określa informacja zawarta w chromosomie Y. Nie ma zatem znaczenia ilość występujących chromosomów X – genetyczne różnice między płcią męską i żeńską są uwarunkowane obecnością chromosomu Y [11].

Termin regulacja płci może odnosić się zarówno do separacji odpowiednich plemników, jak i rozwijających się już zarodków o określonej uprzednio płci. Jednak uzyskiwanie zarodków, mimo stosowania technik superowulacji czy zapłodnienia *in vitro*, jest czasochłonne i wciąż wiąże się ze znacznymi kosztami. W związku z tym znacznie bardziej efektywna byłaby możliwość sterowania płcią, poprzez odpowiedni rozdział plemników na dwie frakcje. Plemniki takie mogłyby być wykorzystane do inseminacji lub zapłodnienia *in vitro*.

Zainteresowanie metodami rozdziału plemników zwierząt notuje się już od czasu wprowadzenia inseminacji do praktyki hodowlanej. Początkowo jednak zasadniczą barierą pozostawał brak wiarygodnych i szybkich metod identyfikacji „płci" plemników, a także możliwości skutecznego odseparowania „rozpoznanych" już frakcji. U większości gatunków ssaków chromosom Y jest najmniejszym, bądź jednym z najmniejszych elementów w całym komplecie [13, 16]. Większość metod, stosowanych dotąd do rozpoznawania plemników niosących chromosomy X i Y, polegała na wykorzystaniu różnic budowy i wielkości pomiędzy tymi dwoma chromosomami. Obecnie istnieje kilka sposobów rozróżniania plemników niosących chromosomy X i Y. Opierają się one bądź na zjawisku fluorescencji tzw. ciałek F, znalezionych w zawierających chromosom Y plemnikach człowieka, knura, królika, ogiera i psa [6, 26], bądź też na wykorzystaniu metody podwójnej hybrydyzacji *in situ* [14] lub pośredniej analizy chromosomalnej. Ta ostatnia metoda polega na rozpoznaniu chromosomu Y, które można przeprowadzić po wniknięciu plemnika do oocytu i utworzeniu przedjądrza [31]. Metody te są jednak przydatne raczej do weryfikacji „płci" po rozdzieleniu plemników, niż do oznaczania ich w celu dalszej separacji.

Równocześnie z badaniami nad indentyfikacją „płci" plemników prowadzono – w przypadku bydła już od lat pięćdziesiątych – próby fizycznego rozdziału nasienia na frakcje męską i żeńską oraz wykorzystania ich do zapłodnienia.

Biorąc pod uwagę różnice w długości chromosomów X i Y zakładano występowanie pewnego zróżnicowania w ciężarze plemników. Założenie to próbowano wykorzystać rozdzielając plemniki w gradiencie stężeń albuminy surowicy krwi. Plemniki z chromosomem Y, jako lżejsze i w związku z tym szybsze, powinny łatwiej przenikać przez granice stężeń. W poszczególnych warstwach płynu powinna zatem zaznaczyć się przewaga jednej z frakcji. Zastosowanie tej metody do rozdziału nasienia ludzi [4], buhajów [3] i królików [33] dało niewielkie, statystycznie nieistotne, odchylenie proporcji płci. Te same założenia starano się wykorzystać wirując plemniki w gradiencie Percollu. Spodziewano się, że plemniki X, jako cięższe, osadzą się w niższych warstwach płynu. Technika ta, zastosowana do separacji nasienia ludzkiego, pozwoliła uzyskać frakcję X o dużej czystości – 94%. Niekorzystnym zjawiskiem był jednak mały odzysk tych plemników, wynoszący 17-30% całej populacji [24]. Próby rozdziału nasienia buhajów tą metodą nie dały pozytywnych rezultatów [15].

W badaniach nad nasieniem ludzkim stwierdzono, że błona komórkowa plemników z chromosomem X ma wyższy ładunek ujemny niż tych z chromosomem Y, co spowodowane jest prawdopodobnie wyższą ilością glikoprotein zawierających kwas neuraminowy na powierzchni ich błon. W trakcie elektroforezy wolnoprzepływowej udało się uzyskać frakcję zawierającą 89% plemników Y [24]. Niestety badania innych autorów przyniosły odwrotne rezultaty – szybszą frakcją, tzn. z wyższym ładunkiem ujemnym, okazały się plemniki Y [12]. Unasienianie bydła, przeprowadzone nasieniem separowanym elektroforetycznie, nie spowodowało odchyleń w proporcjach płci cieląt [7]. Ponadto podważa się sam fakt istnienia różnic ładunku elektrycznego w swobodnie przemieszanej populacji komórek nie wykazujących widocznych objawów interakcji [2].

Do separacji nasienia próbowano wykorzystywać również metody immunologiczne. Już w latach 70-tych stwierdzono,

że potomstwo samic myszy, traktowanych surowicą z przeciwciałami anty-H-Y, wykazuje zachwiane (na korzyść samic) proporcje płci [5]. Odpowiedzialnym za to zjawisko był antygen zgodności tkankowej H-Y. Jest on stwierdzany u wielu gatunków ssaków, w ok. 50% plemników [1, 8]. Obecnie, zamiast uczulania samic na wspomniany antygen, badacze wiążą duże nadzieje z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych H-Y i magnetycznej metody sortowania. Prace przeprowadzone na nasieniu buhajów wskazują na możliwość uzyskania frakcji plemników X o ponad 98% czystości [27]. Wadą tej techniki jest bardzo wysoki koszt uzyskania przeciwciał monoklonalnych i możliwość odseparowania tylko jednej zdolnej do zapłodnienia frakcji plemników – X.

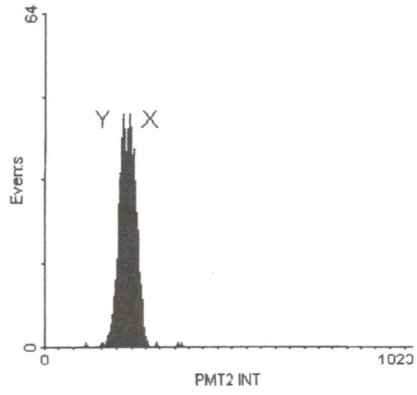
Obecnie największe zainteresowanie budzi możliwość rozdziału plemników przy pomocy cytometrii przepływowej. Pomysł jej wykorzystania do rozdziału nasienia według „płci" narodził się na początku lat 80-tych, kiedy Pinkel i wsp. [28] stwierdzili możliwość dokonania precyzyjnego pomiaru DNA oraz różnic jego zawartości pomiędzy plemnikami niosącymi chromosom X lub Y. Barwili oni utrwalone plemniki kilku gatunków ssaków bromkiem etydyny, mitramycyną lub DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol). Podobne badania z wykorzystaniem fluorochromu Hoechst 33342 (bisbenzimidazol) przeprowadził Keeler i wsp. [22]. Barwnik ten, stosowany obecnie w pracach nad sortowaniem 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 (rys.).

Niekorzystne zjawisko „soczewkowania" fluorescencji plemników, polegające na skupianiu światła w kierunku krawędzi główki, spowodowało konieczność stosowania specjalnie zmodyfikowanych cytometrów [19]. Modyfikacje te, obejmujące odpowiednie ukształtowanie dyszy wylotowej urządzenia oraz odczytywanie fluorescencji DNA z dwóch ustawionych pod kątem 90° detektorów, mają na celu analizowanie i sortowanie plemników ułożonych pod jednakowym kątem względem osi odczytu.

Pierwszych prób sortowania nasienia tą metodą dokonano w drugiej połowie lat 80-tych [17]. Nasienie buhaja, knura i tryka zostało dla ułatwienia analizy pozbawione witek. Dokonując, po odsortowaniu, powtórnej jego analizy stwierdzono, że dokładność rozdziału tak przygotowanych plemników wynosiła ponad 90%. Ustalono również, że różnice w zawartości DNA plemników buhaja, knura i tryka wynoszą odpowiednio: 3,9; 3,7 i 4,2%. Kolejne badania [25] wykazały, iż barwione związkiem Hoechst 33342 oraz 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.

Tabela
Rozwój *in vitro* zarodków bydlęcych po mikroiniekcji (ICSI) seksowanych plemników do oocytów

Frakcja plemników	Liczba oocytów	Stadium rozwoju zarodka					Uzyskane zarodki	
		2b	3-8b	16b	morula	blastocysta	szt.	%
X	111	7	14	2	3	2	28	25
Y	108	9	12	0	2	0	23	21
Razem	219	16	26	2	5	2	51	23



Rys. Obraz fluorescencji DNA plemników buhaja, barwionych związkiem Hoechst 33342; widoczne dwa „piki" reprezentujące grupy plemników Y i X

W pełni skutecznego rozdziału plemników dokonano w końcu lat 80-tych na nasieniu królika [18]. Reanaliza nasienia świeżego, barwionego fluorochromem Hoechst 33342, wykazała, że dokładność separacji wynosiła 86% w przypadku plemników „żeńskich" oraz 81% w przypadku plemników „męskich". Rozdzielone plemniki wprowadzane były chirurgicznie do macicy królic. Uzyskano około 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 [20]. Również w tym przypadku skuteczność rozdziału oceniano 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%.

W połowie lat 90-tych istotnym ograniczeniem w stosowaniu metody cytometrycznego seksowania plemników była niewielka szybkość sortowania, osiągającą przeciętnie 100-200 komórek/sekundę, a także znacznie obniżona ruchliwość plemników. Prace przeprowadzane w tym okresie wykazały, że nasienie separowane w ten sposób może być stosowane do zapłodnienia tylko poprzez mikroiniekcję plemników do oocytu [23], *in vitro* [9], a w najlepszym przypadku laparoskopową inseminację domaciczną [10]. Obecnie, po wprowadzeniu cytometrów przepływowych nowej generacji, możliwe jest osiągnięcie separacji od 6-20 mln/godz. plemników jednej frakcji, przy czystości od 80% do powyżej 90% (metoda Beltsville Sexing Technology) [21]. Stanowi to 30-60 krotny wzrost szybkości w stosunku do 1989 roku. Nasienie zachowuje przy tym na tyle zadowalającą ruchliwość, że możliwe staje się przeprowadzenie inseminacji. W cyklu 11 doświadczeń, po inseminacji 1000 jałówek nasieniem pochodzącym od 22 buhajów, uzyskano płodność 45-49%, oraz „czystość" potomstwa: ♀ – 82-95% oraz ♂ – 86-92% [29].

Badania nad sortowaniem nasienia buhaja prowadzone są również w Zakładzie Fizjologii Rozrodu Zwierząt IZ w Balicach. „Seksowania" nasienia dokonuje się przy wykorzystaniu cytometru przepływowego Epics Elite. Nasze prace koncentrowały się z jednej strony na przystosowaniu cytometru do bardziej precyzyjnego pomiaru DNA w plemnikach, z drugiej zaś na określaniu warunków przygotowania nasienia do badań cytometrycz-

nych. W efekcie wykonanych przez nas doświadczeń uzyskaliśmy dość skuteczny rozdział plemników. Ze względu jednak na niską żywotność sortowanych plemników, ich wykorzystanie do zapłodnienia komórek jajowych mogło nastąpić tylko na drodze mikrochirurgicznej, czyli poprzez zastosowanie tzw. metody ICSI (intracytoplasmic sperm injection).

Mikroiniekcji sortowanymi plemnikami poddano 219 oocytów. Z liczby tej uzyskano 51 zarodków w różnych stadiach rozwoju – od 2-blastomerowych do blastocysty, co stanowi 23% ogólnej liczby oocytów (tab.). W wyniku reakcji PCR u 30 zarodków stwierdzono obecność DNA gatunkowego bydlęcego i te poddano seksowaniu z wykorzystaniem primerów Y1 i Y2. Z 18 zarodków rozwijających się po iniekcji plemników frakcji X do oocytów, płeć żeńską stwierdzono u 16 (88,9%), a męską u 2 zarodków (11,1%), znajdujących się w stadium moruli i blastocysty. Są to zachęcające rezultaty oceniane z punktu widzenia dokładności sortowania. Natomiast niezbędne są dalsze badania nad poprawą ruchliwości sortowanych plemników, tak, aby można było je użyć do inseminacji lub zapłodnienia *in vitro*. Zastosowana bowiem przez nas metoda mikrochirurgicznego zapładniania (ICSI) w przypadku bydła jest mało efektywna.

Literatura: 1. Ali J.I., Eldridge F.E., Koo G.C., Schanbacher B.D.: Arch. Androl. 24, 235-245, 1990. **2. Amann R.P.:** Theriogenology 31, 49-60, 1989. **3. Beal W.E., White L.M., Garner D.L.:** J. Anim. Sci. 58, 1432-1436, 1984. **4. Beernink F.J., Dmowski W.P., Ericsson R.J.:** Fertil. Steril. 59, 382-386, 1993. **5. Bennett D., Boyse E.A.:** Nature 246, 308-309, 1973. **6. Bhattacharya B.C., Evans B.M., Shome P.:** Int. J. Fert. 24, 256-259, 1979. **7. Blottner S., Bostedt H., Hewes K., Schill W.B.:** Proc. 12th Int. Congr. Anim. Reprod. Hague, 1, 411-414, 1992. **8. Bradley M.P.:** J. Dairy Sci. 72, 3372-3380, 1989. **9. Cran D.G., Johnson L.A., Miller N.G.A., Cochrane D., Polge C.:** Vet. Rec. 132, 40-41. **10. Cran D.G., McKelvey W.A.C., King M.E., Dolman D.F., McEvoy T.G., Broadbent P.J., Robinson J.J.:** Theriogenology 47, 267. **11. Davis R.M.:** J. Med. Genet. 18, 161-195, 1981. **12. Engelmann U., Krassnigg F., Schatz H., Schill W.B.:** Gamete Res. 19, 151-159, 1988. **13. George F.W., Wilson J.D.:** Sex determination and differentiation. The Physiology of Reproduction. Raven Press, s. 3-26. New York, 1988. **14. Han T., Ford J.H., Webb G.C., Flaherty S.P., Correl A., Matthews C.D.:** Mol. Reprod. Dev. 34, 308-313, 1993. **15. Iwasaki S., Shioya I., Masuda H., Hanada A., Nakahara T.:** Theriogenology 30, 1191-1198. **16. Jaszczak K., Sysa P.:** Regulacja płci u zwierząt gospodarskich. Biotechnologia Zwierząt, s.500-520. PWN, Warszawa 1997. **17. Johnson L.A., Clark R.N.:** Gamete Res. 21, 335-343, 1988. **18. Johnson L.A., Flook J.P., Hawk H.W.:** Biol. Reprod. 41, 199-203, 1989. **19. Johnson L.A., Pinkel D.:** Cytometry 7, 268-273, 1986. **20. Johnson L.A.:** Reprod. Dom. Anim 26, 309-314, 1991. **21. Johnson L.A., Welch G.R.:** Theriogenology 52, 1323-1341, 1999. **22. Keeler K.D., Mackenzie N.M., Dresser D.W.:** J. Reprod. Fertil. 68, 205-212, 1983. **23. Medvedev S., Bossak N., Eckert J., Lucas-Hahn A., Niemann H., Johnson L.A.:** Theriogenology 47, 270, 1997. **24. Mohri H., Oshio S., Kaneko S., Kobayaji T., Iizuka R.:** Dev. Growth. Dif. 28, 35-36, 1986. **25. Morrell J.M., Dresser D.W.:** Mut. Res. 224, 177-183, 1989. **26. Ogawa S., Yamakawa A., Yamanoi J., Nishida S., Kano Y., Takeshima T., Tauchi K., Nagashima H.:** Theriogenology 29, 1083-1089, 1988. **27. Peter A.T., Jones P.P., Robinson J.P.:** Theriogenology 40, 1177-1185, 1993. **28. Pinkel D., Lake S., Gledhill B.L., Van Dilla M.A., Stephenson D., Watchmaker G.:** Cytometry 3, 1-9, 1982. **29. Seidel G.E., Schenk J.L., Herickhoff L.A., Doyle S.P., Brink Z., Green R.D., Cran D.G.:** Theriogenology 52, 1407-1420,1999. **30. Stern C.:** Am. J. Hum. Genet. 9. 147-165,1957. **31. Tateno H., Mikamo K.:** J. Reprod. Fertil. 81, 119-125, 1897. **32. Vogel F., Motulsky A.G.:** Human Genetics, Springer Verlag, Berlin 1979. **33. Zavos P.M.:** Theriogenology 23, 875-879, 1985.

W hodowli bydła stawiamy na jakość

Hanna Czaja, Zenon Choroszy, Bogumiła Choroszy

W przededniu przystąpienia Polski do UE hodowcy bydła muszą sobie zdawać sprawę z tego, że przedmiotem negocjacji warunków akcesu będzie wielkość produkcji bydlęcej, tzw. kwota, natomiast dobra jakość produktów będzie sprawą bezdyskusyjną. Mamy więc mało czasu, aby dostosować standardy jakościowe naszej produkcji do standardów unijnych. W związku z tym, prace badawcze nad poprawą genetycznej wartości krajowej populacji bydła muszą być ukierunkowane właśnie na jakość. Wysoką produkcję oraz jakość produktów można uzyskać tylko od ras wyspecjalizowanych. Polscy hodowcy zdający sobie sprawę z tego faktu, zdecydowali o zmianie dwukierunkowego typu użytkowego krajowej populacji bydła czarno- i czerwono-białego na jednostronnie mleczny. Natomiast produkcja młodego żywca wołowego nie może być w Polsce prowadzona w taki sposób, jak w krajach posiadających duże populacje bydła mięsnego, ponieważ nasz żywiec pochodzi głównie ze stad mlecznych. Dlatego też badania, które podejmuje Instytut Zootechniki, skierowane są z jednej strony na poprawę ilości, a głównie jakości mleka, z drugiej zaś na opracowanie systemów produkcji żywca i poprawę jakości mięsa wołowego.

Powszechne w Polsce, w doskonaleniu krajowej populacji bydła mlecznego, stało się korzystanie z osiągnięć światowej genetyki, przy równoczesnym prowadzeniu własnych programów doskonalenia.

Genetyczne doskonalenie ras bydła użytkowanych w Polsce opiera się na programach hodowlanych dla poszczególnych ras. Od wielu lat doskonali się populację bydła czarno-białego za pomocą bydła holsztyńsko-fryzyjskiego, pochodzącego z USA, Kanady i krajów europejskich. Ponieważ mamy w kraju różne warunki środowiskowo-żywieniowe, znaczny dolew krwi h.f. stosuje się na większą skalę tylko w gospodarstwach specjalistycznych, w których baza paszowa pozwala na wysoką produkcję mleka. W wyniku zorganizowanej pracy hodowlanej w zakresie doskonalenia bydła rasy c.b., opierając się na doświadczeniach krajów zachodnich, importowano do Polski znaczne ilości nasienia buhajów sprawdzonych i wysoko ocenionych. Import ten zasadniczo wpłynął na genotyp naszego bydła i wyraźnie poprawił wydajność mleczną. Poprawie uległy też: budowa i typ oraz wielkość i kształt wymienia.