

Metody oraz ekonomiczne znaczenie sterowania proporcją płci u bydła

Grzegorz Grzybowski

Edward Dymnicki

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt

Polska Akademia Nauk

Jastrzębiec

1. Wstęp

Znalezienie uniwersalnego środka, który umożliwiłby skuteczny wpływ na płeć potomstwa zaprzętało uwagę ludzkości już od stuleci. W odniesieniu do selekcji zwierząt gospodarskich realny wpływ na proporcję płci jest szczególnie istotny ponieważ wiąże się z możliwością wprowadzenia optymalnej strategii hodowlano-produkcyjnej dającej pożądane efekty ekonomiczne. W Polsce, praktyka hodowlana nie dysponuje jeszcze efektywnym testem diagnozowania płci opartym na zaawansowanej technologii molekularnej. Kraje o ugruntowanej tradycji w hodowli bydła podejmują badania w celu uzyskania samowystarczalności w zakresie dysponowania metodami związanymi z biotechnikami rozrodu w celu ich stosowania w programie hodowlanym. Szerokie badania z tego zakresu prowadzone są również w Instytucie Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu.

Celem artykułu jest przedstawienie aktualnych poglądów odnoszących się do determinacji płci, omówienie sposobów potencjalnego oddziaływania na proporcję płci, a także wykazanie korzyści ekonomicznych wynikających z wprowadzenia do krajowego programu hodowlanego skutecznego testu umożliwiającego wczesne rozpoznawanie płci zarodków bydłych.

Jest oczywiste, że dysponowanie zwierzętami tylko jednej płci, odpowiednio do wybranego kierunku produkcji zwiększyłoby znacznie jej efektywność. W hodowli mięsnych ras bydła preferowane są osobniki męskie ze względu na szybszy wzrost, lepsze wykorzystanie paszy, lepszą wydajność rzeźną itd. Na przykład, w polskich badaniach nad rosnącym bydlęciem wykazano, że buhajki zużywały aż o 23% mniej suchej masy, białka i energii netto na przyrost 1 kg masy ciała aniżeli jałówki (5). Produkcja w kierunku mlecznym preferuje osobniki płci żeńskiej. Każdy przypadkowo zaimplantowany zarodek płci męskiej nie jest w produkcji ukierunkowanej na mleko

elementem pożądanym. Wiąże się to przede wszystkim ze zmarnowaniem środków na zakup zarodka oraz utrudnieniami w organizacji produkcji.

Zagadnienie wczesnego rozpoznawania płci u bydła nabrało dodatkowego znaczenia w związku z rozwojem programów hodowlanych opartych na metodzie mnogiej owulacji i przenoszenia zarodków (*multiple ovulation and embryo transfer* — MOET). Istotą tych programów jest przełamanie bariery niskiej płodności krów. Powstała możliwość uzyskania kilkudziesięciu sztuk potomstwa od krowy. Osiąga się to poddając krowy-dawczynie zarodków stymulacji hormonalnej (superowulacji). Po zapłodnieniu nasieniem wybranego reproduktora, wypłukuje się z dróg rodnych dawczyń większą liczbę zarodków, które przenosi się do macicy krów-biorczyń bądź bezpośrednio, bądź po dłuższym okresie przechowywania zarodków w głębokim zamrożeniu. Metoda MOET umożliwia znaczne przyspieszenie postępu genetycznego. Na przykład, w wyniku realizacji znanego programu kanadyjskiego „TEAM” (22) uzyskano 55 pełnych rodzin z założonym odstępem między pokoleniami dla testowanych grup buhajów-półbraci o 19% krótszym w stosunku do testowania na podstawie potomstwa. Przewidywany postęp genetyczny jest w tej sytuacji aż o 8-9,5% wyższy. Uwzględniając możliwości związane z biotechnikami rozrodu polegającymi na zapłodnieniu *in vitro* oocytów uzyskanych od jedno do pięciomiesięcznych jałówek, postęp genetyczny mógłby być nawet o 22% większy.

W Polsce realizowany jest także program doskonalenia bydła mlecznego z użyciem metody MOET, opracowany w IGiHZ PAN w Jastrzębcu (31).

Na świecie, zarodki bydłce są przedmiotem obrotu handlowego, a wyspecjalizowane firmy komercyjne oferują metody ich otrzymywania oraz technologie DNA umożliwiające diagnostykę płci. Technologie te są objęte zastrzeżeniami patentowymi. Biorąc pod uwagę, że cena bardzo dobrego zarodka dochodzić może do 2000 USD, stosowana przez wspomniane firmy silna ochrona swego interesu handlowego jest powszechna. W tym kontekście, samowystarczalność w zakresie dysponowania wspomnianymi technologiami niekonwencjonalnego rozrodu nabiera dużej rangi ekonomicznej. Podstawowym ogniwem w tych technologiach jest efektywna diagnostyka płci zarodków (tzw. seksowanie).

2. Sposoby potencjalnego oddziaływania na proporcję płci u zwierząt gospodarskich

Głównymi procesami w ostatecznym uformowaniu płci osobnika są:

— ukształtowanie tzw. płci chromosomowej w czasie zapłodnienia, co w warunkach normalnych jest równoznaczne z nadaniem osobnikowi płci genetycznej,

— uformowanie gonad (jądra lub jajniki) z początkowo bipotentnej, prekursorowej tkanki gonadowej zgodnie z zaprogramowaną płcią genetyczną,

— kształtowanie płci fenotypowej tzn. różnicowanie wewnętrznych i zewnętrznych narządów rozrodczych zgodnie z płcią gonadową (30).

Zwieńczeniem wszystkich wymienionych procesów jest ukształtowanie tzw. płci behawioralnej manifestującej się jako specyficzne libido płciowe tzn. zespół zachowań definiowanych jako zdeterminowanie seksualne w stosunku do osobników płci przeciwnej. Biorąc pod uwagę wymienione procesy determinacji, płć osobnika rozpatrywać można na różnych poziomach biologicznej hierarchiczności. Jednak poza płcią genetyczną, nie mają one w hodowli większego znaczenia. Wszelkie występujące aberracje w zakresie płci gonadowej, fenotypowej, a zwłaszcza behawioralnej są łatwe do zidentyfikowania i podlegają naturalnej i hodowlanej selekcji negatywnej.

Obecnie wyróżnić można dwie główne strategie potencjalnego oddziaływania na proporcję płci u bydła:

- separacja subpopulacji plemników niosących chromosom X i Y,
- ustalanie płci zarodków (tzw. seksowanie) wypłukiwanych z dróg rodnych superowulowanych krów-dawczyń, a następnie ich transfer do macicy krów-biorczyń; drugą możliwością jest transfer do macicy krów-biorczyń seksowanych zarodków, pozyskiwanych w wyniku zapłodnienia oocytów *in vitro* (3,8,15).

W technikach służących do separacji plemników niosących chromosomy płciowe X i Y wykorzystuje się bądź różnice chemiczne w błonie komórkowej, bądź fizyczne odnoszące się zwłaszcza do ich wielkości.

W metodach chemicznych, przeważnie brana jest pod uwagę obecność na plemnikach Y samczego antygeny transplantacyjnego H-Y (35). Głównym elementem tej koncepcji jest separacja subpopulacji plemników przy wykorzystaniu monoklonalnych przeciwciał ukierunkowanych na ten antygen. Technika ta ma jednak znaczenie wyłącznie eksperymentalne. Innym sposobem separacji plemników X i Y jest poddawanie ich działaniu pola elektrycznego. W czasie rozdziału elektroforetycznego plemniki niosące chromosom X migrują szybciej niż plemniki Y (14). Jednak zasadniczą niedogodnością tej metody, całkowicie przekreślającą możliwość jej praktycznego zastosowania jest utrata ruchliwości plemników po elektroforezie.

Techniki separacji plemników niosących informację X i Y opierające się na różnicach fizycznych wykorzystują to, że chromosom X jest większy aniżeli chromosom Y i zawiera więcej DNA. Jafar i Flint podają (14), że związana z wielkością chromosomów różnica gęstości rzędu $0,0007 \text{ g/cm}^3$ umożliwia separację plemników poprzez wirowanie w medium o odpowiednim gradientie. Przy zastosowaniu wirowania w gradiencie Percollu uzyskano podczyszczone (ok. 65-70%) frakcje bydłecych plemników X i Y (20). Analizując je przy zastosowaniu czułych technik cytometrii przepływowej stwierdzono jednak, że efekt separacji był całkowicie iluzoryczny [cyt. za (14)].

Technika cytometrii przepływowej jest aktualnie najlepszym sposobem umożliwiającym separację plemników o informacji X i Y. Opiera się ona na pomiarze względnej zawartości DNA w pojedynczych plemnikach znakowanych barwnikiem fluorescencyjnym. Najnowsze systemy sortowania umożliwiają uzyskiwanie ok. 95% czystości populacji bydłecych plemników X i Y (15). Aktualne możliwości sortowania wahające się w granicach od 4×10^5 do 5×10^5 żywych plemników na godzinę są jednak daleko niewystarczające

z punktu widzenia kryteriów wymaganych w technikach sztucznego unasieniania. Dlatego metoda cytometrii przepływowej do sortowania populacji pleśniaków X i Y nie ma obecnie praktycznego zastosowania. Przewidywać można w przyszłości wzrost znaczenia cytometrii przepływowej przy sterowaniu proporcją płci u bydła o ile eksperymentalne biotechniki rozrodu polegające na dojrzewaniu i zapłodnieniu oocytów *in vitro* osiągną stan większego zaawansowania, umożliwiając zweryfikowanie kosztów i efektywność praktycznych zastosowań tej metody (3,8,16).

Znanych jest wiele innych metod umożliwiających rozróżnienie między płcią męską i żeńską oraz seksowanie zarodków. Wymienia się tu głównie cytogenetyczne techniki analizy kariotypu, ilościowe porównania aktywności niektórych enzymów kodowanych przez *loci* umiejscowione na chromosomie X, porównania różnic tempa wzrostu zarodków XX i XY (zarodki męskie w krótszym czasie osiągają bardziej zaawansowane stadia rozwojowe niż żeńskie) itd. (33). Metody te posiadają jedynie walory teoretycznopoznawcze i nie mają większych perspektyw z punktu widzenia możliwości ich zastosowania w sterowaniu proporcją płci. Wydaje się, że ewentualnie metody analiz kariotypu mogą stanowić w tym względzie pewne pomocnicze uzupełnienie.

W problematyce sterowania proporcją płci u zwierząt gospodarskich na plan pierwszy wysuwają się obecnie technologie DNA wykorzystujące najnowsze zdobycze badań podstawowych związanych z molekularnymi uwarunkowaniami płci genetycznej.

3. Molekularne uwarunkowania płci genetycznej oraz tradycyjne podejście do jej identyfikacji i seksowania zarodków

Inicjacja kształtowania się zespołu cech płciowych na wczesnych etapach rozwoju embrionalnego jest procesem wyboru męskiego lub żeńskiego wzorca rozwojowego. Zaangażowane są w to dwa alternatywne szlaki regulacji ekspresji genów, a wybór jednego z nich zależy od mechanizmu przełączającego, określanego jako *developmental switch* (18,23). U ssaków, samce są heterogametyczne (XY) zaś samice homogametyczne (XX).

Wystąpienie samczego fenotypu jest silnie skorelowane z obecnością chromosomu Y. Przyjęto zatem, że na chromosomie Y obecny jest hipotetyczny gen regulatorowy który nazwano TDF (*testis determining factor*), odgrywający rolę owego biologicznego przełącznika, od którego zależy rodzaj wzorca rozwojowego płci. W 1990 r. opisano u ludzi, myszy i królików poszukiwany gen TDF nadając mu symbol SRY (13). Po wykazaniu, że w wyniku jego wprowadzenia technikami transgenicznymi do mysiego zarodka o kariotypie XX generowany jest fenotyp samczy (19) ostatecznie zaakceptowano, że SRY jest omawianym przełącznikiem determinacji płci u ssaków. Locus SRY opisano u wielu gatunków, w tym u zwierząt gospodarskich (4,13,18). Składa się on z małego bezintronowego centralnie usytuowanego genu o wielkości około 2,8 kb, kodującego domenę białka będącego czynnikiem transkrypcyj-

nym zwanego HMG (*High Mobility Group*) lub HMG box. Omawiany region HMG box wykazuje daleko posuniętą konserwatywność sekwencji między gatunkami. Na przykład, homologia HMG box ludzi i bydła wynosi 83,1% na poziomie sekwencji nukleotydowej i 72,2% w sekwencji aminokwasowej białka (4). HMG box oflankowany jest z obydwu stron repetytywnymi sekwencjami po około 15 kb, które z kolei charakteryzują się wielką zmiennością między gatunkami. Rzeczywista, biologiczna funkcja tych sekwencji nie jest dotychczas jednoznacznie sprecyzowana. Pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami naczelnymi porównanie sekwencji flankujących HMG box wskazuje na zachodzące tu czynne zmiany mutacyjne [cyt. za (4)]. Podobne obserwacje zanotowano przy porównaniu różnych populacji myszy. Wyniki najnowszych badań wskazują, że regulacyjna funkcja białek HMG box związana jest z ich interakcjami poprzez wspomniane sekwencje repetytywne (36). Przyjmuje się zatem, że locus SRY odgrywa istotną rolę w procesie kształtowania gatunków jako genetyczny ośrodek tworzenia bariery rozrodowej między formującymi się populacjami. Fakt, że sekwencje flankujące HMG box nie wykazują praktycznie żadnej homologii między gatunkami stał się inspiracją wykorzystania tej ich właściwości do diagnozowania płci technikami molekularnymi przy wykorzystaniu łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR). W badaniach światowych koncepcja ta, w sytuacji braku innej, jest wciąż bardzo powszechna i mimo swej niedoskonałości ciągle jeszcze stosowana przez firmy komercyjne. Opisano już wiele gatunkowo-specyficznych primerów umożliwiających amplifikację sekwencji charakterystycznych dla chromosomu Y u podstawowych gatunków zwierząt gospodarskich (bydło, owce, kozy, świnie, konie) (2,25,27,28,34). Omawiana koncepcja oparta jest na tym, że z genetycznego punktu widzenia różnica między osobnikami żeńskimi i męskimi polega na obecności w genomie chromosomu Y. Zatem należy wykryć chromosom Y w genomie aby skutecznie zdiagnozować płć osobnika. Założenie to jest generalnie słuszne. Jednakże zasadniczą, obiektywną wadą praktyczną jest to, że w przypadku płci żeńskiej wynik testu nie manifestuje się obecnością jakiegokolwiek produktu PCR.

Z uwagi na brak wewnętrznej kontroli testu, wynik taki jest nie do odróżnienia od wszelkich pomyłek i niedokładności, które ostatecznie prowadzą do identycznego rezultatu. Stwarza to możliwość uzyskania całkowicie zafałszowanych wyników. Na przykład, stan taki może mieć miejsce przy niedokładnościach na wielu etapach procedury laboratoryjnej, np. przy biopsji komórek, ekstrakcji DNA, przy przeprowadzaniu łańcuchowej reakcji polimerazowej itd. Nawet tak pozornie błahie i niezależne od eksperymentatora przyczyny jak nieco obniżona jakość wody do zbuforowania komponentów PCR, obniżony poziom jonów magnezu Mg^{2+} w reakcji, domieszka w mieszaninie reakcyjnej PCR sulfotlenku dodecyłu (*sodium dodecyl sulphate* — SDS) lub innych czynników inhibujących aktywność polimerazy DNA, domieszka hemoglobiny, obniżona jakość odczynników itd., prowadzić może do całkowitych niepowodzeń w badaniach, tzn. braku amplifikacji analizowanego odcinka genu. W przypadku omawianych metod identyfikacji płci opartych na amplifikacji sekwencji charakterystycznej dla chromosomu Y, najistot-

niejsze jest to, że eksperymentator nie jest w stanie odpowiednio szybko rozpoznać wymienionych uchybień, co ostatecznie może prowadzić do mylnej interpretacji wyników. Reasumując, zawsze powstaje niemożliwa do usunięcia wątpliwość czy brak produktu PCR oznacza płęć żeńską czy też faktycznie mamy do czynienia z próbką pobraną od osobnika męskiego w której nie zaszła efektywna amplifikacja analizowanego odcinka genu. Powodować to może istotne rozbieżności w zakresie prawidłowości wyników.

W Polsce, podejmowano już w ostatnim czasie ekperymentalne próby określania płci zarodków bydłych przy wykorzystaniu technik molekularnych (PCR). W diagnostyce płci wykorzystywano opisaną strategię opartą na wizualizacji sekwencji DNA charakterystycznej dla chromosomu Y. W eksperymentach wykorzystywano sekwencje primerów objęte zagranicznymi zastrzeżeniami patentowymi. Wyniki tych badań opublikowano w 1995 r. (37). Rezultaty omawianych prac będących bardzo cennymi informacjami praktycznymi dla aktualnie prowadzonych badań wskazują m.in. na źródła potencjalnych zagrożeń dla wiarygodności wyników. Na przykład, we wstępnych próbach określenia płci 113 par: zarodek-biopsja, zgodność wyniku uzyskano tylko w 8 przypadkach. Autorzy sugerują, że powodem tego stanu były błędy przy pobieraniu komórek podczas biopsji i ich przenoszenia do próbek, w których były przeprowadzane reakcje PCR.

Elementem przesądającym o przydatności i walorach praktycznych testu jest obecność lub brak wewnętrznej kontroli i związana z tym możliwość wiarygodnego zweryfikowania prawidłowości przebiegu całej procedury identyfikacyjnej. Dlatego w dziedzinach, gdzie pomyłka w oznaczeniu płci w biologicznej próbce stanowiącej dowód rzeczowy może mieć bardzo daleko idące reperkusje (np. w medycynie sądowej), obserwuje się odchodzenie od koncepcji wykorzystywania do testów PCR sekwencji charakterystycznych dla chromosomu Y. Zasadniczym powodem jest fakt, że testy oparte na tej strategii nie posiadają dostatecznego zabezpieczenia kontrolnego, wykluczającego pomyłki związane z wadliwym przebiegiem procesu PCR. Również w Polsce omawiana metoda diagnostyki płci straciła swe dawne znaczenie ponieważ obecnie dostępne są znacznie efektywniejsze procedury molekularne, umożliwiające określenie płci osobnika na podstawie DNA ze śladów biologicznych z prawdopodobieństwem graniczącym z pewnością (24,26). Niewątpliwie najnowocześniejszymi technologiami stosowanymi w badaniach osobniczej zmienności DNA są zautomatyzowane procedury sekwencjonowania. Aktualnie wykorzystuje się do tego celu automaty nowej generacji zwane sekwenatorami DNA. We wszystkich znanych typach sekwenatorów detekcja polega na laserowym wzbudzeniu fluorescencyjnie wyznakowanych produktów i odbywa się w środowisku żelu denaturującego bezpośrednio podczas rozdziału elektroforetycznego. Kontrolowana przez laser szybkość migracji produktów sekwencjonowania jest automatycznie przetwarzana na kolejność (sekwencję) zasad w analizowanym genie lub jego fragmencie. Bezpośrednie, automatyczne sekwencjonowanie produktów PCR całkowicie eliminuje uciążliwy etap klonowania. Dlatego szybkość, dokładność, a przede wszystkim zakres informacji genetycznych możliwych do uzyskania tym sposobem są nieporównywalnie

większe od możliwości wszystkich innych technik molekularnych. W Polsce, technika automatycznego bezpośredniego sekwencjonowania produktów PCR jest już praktycznie stosowana w multipleksowym teście STR/AMG, zoptymalizowanym pod kątem diagnozowania płci i osobniczej identyfikacji u ludzi (24). Natomiast w odniesieniu do genomu zwierząt gospodarskich została ona po raz pierwszy zastosowana w 1996 r. do identyfikacji istotnych gospodarczo mutacji BLAD i DUMPS u bydła (11,12). Pewnym mankamentem zautomatyzowanych technik bezpośredniego sekwencjonowania produktów PCR są stosunkowo wysokie koszty przeprowadzania eksperymentów. Z tego względu, omawiana grupa technik nie może być obecnie wykorzystywana na masową skalę w rutynowych procedurach seksowania zarodków bydła.

Saberivand i Outteridge podają (33), że przy seksowaniu zarodków bydłych techniką PCR uzyskać można blisko 100% dokładność wyników przy zastosowaniu dwóch lub trzech zestawów primerów dla sekwencji charakterystycznych dla chromosomu Y oraz dodatkowo (jako wewnętrzna kontrola), zestawu primerów umożliwiających amplifikację produktów jakiegoś autosomalnego locus. Przydatność technik molekularnych do wczesnego rozpoznawania płci genetycznej jest zatem duża. Wydaje się jednak, że seksowanie zarodków na bardziej masową skalę przy zastosowaniu tak rozbudowanej procedury nie byłoby ekonomicznie uzasadnione.

Z punktu widzenia praktycznych możliwości, rutynowych zastosowań w programie genetycznego doskonalenia bydła, głównym kryterium przydatności stosowanej procedury seksowania zarodków jest oprócz niezawodności, jej prostota, powtarzalność wyników, stosunkowo mała pracochłonność i względnie niskie koszty wykonywania testów.

Poszukuje się zatem na świecie nowych obiektów w genomie, których wykrywanie ogniskowałoby w sobie wspomnianą niezawodność (dokładność) metod seksowania z jednoczesną minimalizacją przeznaczonych na ten cel środków finansowych.

W Polsce, zagadnienie identyfikacji płci u bydła (seksowania zarodków) pozostaje także aktualnym problemem badawczym, wciąż oczekując na praktyczne wdrożenie do programu hodowlanego.

4. Określanie płci u bydła poprzez wykrywanie genów markerowych dla chromosomów X i Y

Najnowszym obiektem badań światowych jest gen amelogeniny, którego struktura może być elementem niekonwencjonalnej diagnostyki płci u bydła. W Polsce, zagadnienie to podjęto w IGiHZ PAN w Jastrzębcu na przełomie 1995/1996 r. Pierwsze uzyskane rezultaty (10,32) pozwalają oczekiwać, że już w niedługim czasie polska hodowla może dysponować własnym, efektywnym testem diagnozowania płci u bydła, opartym na zaawansowanej technologii DNA.

Gen amelogeniny jest stosunkowo mało znany w dziedzinie badań genomu

zwierząt gospodarskich. Leży on głównie w orbicie zainteresowań medycyny i stomatologii. Amelogenina jest głównym białkiem macierzy pozakomórkowej w związkach zębowych syntetyzowanym w wyspecjalizowanych komórkach — ameloblastach. Białko to jest podstawowym ogniwem formowania szkliwa zębowego. Dziedziczny defekt formowania szkliwa u ludzi znany jest jako zespół *amelogenesis imperfecta*. Jego etiologia, jak się przypuszcza, związana jest z czynnościową aberracją kariotypową polegającą na niepełnej inaktywacji (lub całkowitym braku inaktywacji) jednego z chromosomów X w genomie (38). W 1989 r. Lau i wsp. (21) wykorzystując w eksperymentach hybrydacyjnych cDNA amelogeniny myszy stwierdzili, że ludzkie sekwencje kodujące amelogeninę obecne są na krótkim ramieniu chromosomu X (Xp22.3-p22.1) oraz blisko centromeru na chromosomie Y (Yp11). W badaniach tych wykazano także, że gen bydlęcej amelogeniny z pewnością obecny jest u tego gatunku na chromosomach płciowych. Fakt ten jako pochodzący w zasadzie z dziedziny badań nad genomem ludzkim jest wśród specjalistów zajmujących się mapowaniem genomu bydła domowego zapewne mało znany. W żadnej z dotychczas opublikowanych map genomu bydła domowego, włącznie z wydaniem najnowszym (6) locus amelogeniny nie jest uwzględniony. Jednakże jego zmapowanie na chromosomach X i Y u bydła nie ulega wątpliwości, czego potwierdzeniem jest najnowsze opracowanie porównawcze genomów u gatunków *Homo sapiens*, *Bos taurus* i *Mus musculus* (39). Główne informacje o cechach strukturalnych oraz fizjologicznych uwarunkowaniach genu amelogeniny bydlęcej pochodzą z przeprowadzonych w ostatnim czasie badań Gibsona i wsp. (9). Rezultaty cytowanych prac wskazują, że u różnych gatunków gen amelogeniny, umiejscowiony na chromosomie Y, posiada charakterystyczną cechę tzn. delecję nukleotydową. U bydła wynosi ona 61 par zasad. Wspomniana delecja może być charakterystycznym wyróżnikiem (markerem) do diagnostyki w genomie obecności chromosomów X i Y, a zatem do diagnostyki płci homo- i heterogametycznej. Pierwsze na świecie badania z zakresu diagnostyki płci genetycznej u ludzi na podstawie polimorfizmu sekwencji genu amelogeniny przeprowadzone zostały przez Akane i wsp. w 1991 r. (1) dla potrzeb medycyny sądowej. W Polsce, obszerne badania z tego zakresu przeprowadzone zostały w 1993 r. przez Pawłowskiego (26). Najnowszym zastosowaniem zmienności genu amelogeniny u ludzi jest opracowany w Polsce multipleksowy test STR/AMG oparty na automatycznej analizie fragmentów i sekwencji DNA generowanych techniką PCR. Umożliwia on niezawodną identyfikację osobniczą i dochodzenie ojcostwa (24). We wspomnianym multipleksie amplifikowanych jest jednocześnie w jednej reakcji PCR kilkanaście różnych produktów autosomalnych loci oraz jeden produkt w locus amelogeniny dla osobnika płci homogametycznej (kobieta XX) oraz dwa produkty dla osobnika płci heterogametycznej (mężczyzna XY). Również inne laboratoria światowe zajmujące się genomem człowieka opracowują multipleksowe testy służące do osobniczej identyfikacji w których uwzględniany jest locus amelogeniny (17,29).

W dziedzinie badań nad bydłem, pierwszą informację o możliwości zastosowania polimorfizmu genu amelogeniny do identyfikacji płci opublikowano

na świecie w końcu 1994 r. (7). Wskazywano przy tym na bardzo istotny walor tej metody tzn. obecność wewnętrznej kontroli procesu amplifikacji co wyklucza jakąkolwiek pomyłkę, szczególnie przy diagnostyce płci żeńskiej. Niemożliwa jest tu bowiem sytuacja, że w reakcji PCR nie jest generowany żaden produkt. O ile fakt taki ma miejsce wskazuje to jednoznacznie na jakieś uchybienie w teście, a nie tak jak w poprzednich metodach opartych na diagnostyce sekwencji chromosomu Y, na płęć żeńską. Jest to istota wspomnianej już wewnętrznej kontroli testu.

IGiHZ PAN dysponuje już efektywnym testem diagnozowania płci genetycznej u bydła przy wykorzystaniu próbek genomowego DNA izolowanego z krwi (10,32). Podstawowym elementem wspomnianego testu są dwa oryginalne profile termiczne umożliwiające wydajną amplifikację sekwencji bydłowego genu amelogeniny klasy I i II podczas łańcuchowej reakcji polimerazowej (PCR).

5. Ekonomiczne znaczenie sterowania proporcją płci u bydła

Istotą i celem selekcji hodowlanej jest zwiększenie postępu genetycznego (Δ_g). Jest on przekazywany na czterech odrębnych ścieżkach: ojciec-syn, ojciec-córka, matka-syn i matka-córka. W zakresie ścieżki ojciec-syn i ojciec-córka osiągnięto bardzo duży postęp genetyczny głównie poprzez sztuczne unasienianie. Jest to aktualnie najbardziej skuteczna i ekonomicznie najefektywniejsza biotechnologia dzięki której osiąga się poprawę, np. w stonku do wydajności mleka krów ok. 1,5% na rok (22). Ścieżki ojciec-syn i ojciec-córka mają główny udział w postępie genetycznym ze względu na możliwości ogromnego zwiększenia stopnia rozrodczości ojców. W związku z tym intensywność selekcji buhajów może być wydatnie zwiększona.

Natomiast techniki mnogiej owulacji i przenoszenia zarodków (MOET) pozwalają na przełamanie bariery niskiej płodności krów. Ma to duże znaczenia w doskonaleniu bydła. Jest bowiem oczywiste, że użycie mniejszej liczby krów — jako matek buhajów umożliwi ostrzejszą selekcję tej grupy zwierząt. W tym kontekście, wprowadzenie w warunkach produkcyjnych skutecznego testu umożliwiającego szybkie określenie płci genetycznej zarodków byłoby dodatkowym elementem umożliwiającym zwiększenie postępu genetycznego przy wydatnie zmniejszonych kosztach zabiegów genetyczno-selekcyjnych.

Znaczenie techniki seksowania zarodków polega przede wszystkim na stworzeniu możliwości zwiększenia postępu genetycznego na ścieżkach matka-syn i matka-córka. Zagadnienie to objaśnić można analizując składowe postępu genetycznego.

Postęp genetyczny (Δ_g) wyrazić można wzorem:

$$\Delta_g = i \cdot r_{ig} \cdot \delta_g$$

gdzie: i - oznacza intensywność selekcji,

r_{ig} - dokładność oceny wartości hodowlanej,

δ_g - zmienność genetyczną wyrażoną poprzez średnie standardowe odchylenie genetyczne

Wartość i zależy od procentu zwierząt wybranych jako rodziców następnego pokolenia. Można ją wyrazić jako iloraz różnicy selekcyjnej ($x - \bar{x}$) i średniego standardowego odchylenia fenotypowego δ_p

$$i = \frac{x - \bar{x}}{\delta_p}$$

U bydła mlecznego, przy wprowadzeniu testu skutecznie prognozującego płęć urodzonego potomstwa wystarczające byłoby użycie tylko połowy stawki krów-matek buhajów aby uzyskać konieczną liczbę buhajków i połowę stawki krów w stadzie do wyprodukowania jałówek na jęgo remont.

Wartość r_{ig} zależna jest od wielkości współczynnika odziedziczalności (h^2) dla danej cechy i może być wyrażona poprzez jego pierwiastek kwadratowy ($r_{ig} = \sqrt{h^2}$). Odnosi się to jednak tylko do sytuacji kiedy wartość hodowlana danej cechy kalkulowana jest na podstawie własnej wydajności. Natomiast w przypadku kalkulacji na podstawie wydajności potomstwa, dokładność oceny wartości hodowlanej zależna jest nie tylko od wartości h^2 , lecz również od liczby potomstwa wykorzystanego do oceny. Przyjąć można, że dla cech wydajności mleka odziedziczalność (h^2) wynosi około 0,25. Natomiast wielkość r_{ig} równa jest 0,5.

Komponent postępu genetycznego wyrażany jako wartość δ_g jest miarą zmienności genetycznej w populacji. Dla cech użytkowości mlecznej za podstawę analizy przyjąć można 200 kg mleka, 8 kg tłuszczu i 6,5 kg białka.

W tabeli 1 przedstawiono wielkość postępu genetycznego w zakresie wydajności mleka w zależności od liczby wybranych krów na matki przyszłego pokolenia. W normalnych warunkach produkcyjnych odnoszących się do realiów polskiej hodowli bydła, w najcenniejszych genetycznie stadach zarodowych z których rekrutują się kandydatki na matki buhajów, faktycznie na ten cel przeznaczają się 10% krów. Natomiast 80% stawki krów przeznaczają się na reprodukcję stada. Wprowadzenie testu skutecznie prognozującego płęć zarodków umożliwiłoby zatem hodowcy realny wpływ na proporcję płci przychówka i obniżenie omawianych wartości odpowiednio do 5 i 40%. W przypadku ścieżki matka-syn przyniosłoby to zwiększenie postępu genetycznego o 17,7%. Natomiast w przypadku ścieżki matka-córka postęp genetyczny byłby aż o 177,1% większy (tab. 1).

Biorąc pod uwagę szybkość rotacji pokoleń i biologię rozrodu bydła domowego, średni odstęp między pokoleniami na ścieżce matka-syn wynosi około 6 lat, natomiast na ścieżce matka-córka 4 lata. W przeliczeniu na jeden rok, omawiany postęp genetyczny wynikający z faktu seksowania zarodków wyrażać się będzie 3 kg mleka na ścieżce matka-syn i aż 44 kg na ścieżce matka-córka. Przedstawione przykłady możliwych korzyści ekonomicznych wynikających ze sterowania proporcją płci nie wyczerpują jednak

TABELA 1
WIELKOŚĆ POSTĘPU GENETYCZNEGO WYDAJNOŚCI MLEKA W ZALEŻNOŚCI OD LICZBY WYBRANYCH KRÓW
JAKO MATKI PRZYSZŁEGO POKOLENIA

Ścieżka	wybrane krowy (%)	i	r_{ig}	δ_g	Δ_g
matka-syn*	10	1,75	0,5	200	175
matka-córka*	80	0,35	0,5	200	35
matka-syn**	5	2,06	0,5	200	206
matka-córka**	40	0,97	0,5	200	97
% zwyżki					
matka-syn					17,7%
matka-córka					177,1%

* stan dotychczasowy, ** stan w przypadku seksowania.

całości omawianego zagadnienia. Szczególnie pożytecznym zastosowaniem metod seksowania zarodków byłoby na przykład implantowanie męskich zarodków bydła mieszańcowego mlecznym krowom-biorczyniom w celu uzyskania wysokowartościowego bydła opasowego. Przypomnieć należy cytowane wcześniej wyniki badań dotyczące lepszego wykorzystania paszy przez buhajki o ponad 20% (5), a także fakt, że mieszańce bydła ras mlecznych z bydem ras mięsnych odznaczają się lepszymi wynikami opasu i lepszą jakością tuszy. W tej sytuacji, dodatkowe korzyści wyrażone w przychodach hodowcy mogą być nawet 30% wyższe.

Omówione w tym artykule korzyści ekonomiczne odnoszące się do postępu genetycznego związanego z seksowaniem zarodków dotyczyć mogą w dzisiejszych realiach polskiej hodowli jedynie matek buhajów oraz metody mnogiej owulacji i przenoszenia zarodków (MOET). Metoda MOET jest jednak droga jak na polskie warunki.

Innym podstawowym zagadnieniem skuteczności jej stosowania jest wymóg bardzo dobrej organizacji produkcji oraz rozwiązanie problemów dotyczących poprawy zdrowotności populacji, zabezpieczenia paszowego, ograniczenie skali jałowości bydła w Polsce, dobre opanowanie w warunkach terenowych metod synchronizacji rui, superowulacji, przechowywania i transferu zarodków itd.

Wydaje się, że załatwienie przynajmniej części tych spraw uzależnione jest od poprawy stanu infrastruktury gospodarczej kraju, a przede wszystkim od atmosfery wokół polskiego rolnictwa i woli autentycznego rozwiązywania jego problemów. Można jedynie wyrazić nadzieję, że już w bliskiej przyszłości praktyka rolnicza będzie w stanie w pełni wykorzystać możliwości wynikające z aktualnie prowadzonych w Polsce badań nad technologiami DNA, osiągnąć samowystarczalność w tym zakresie, wzbogacając program hodowlany o nowe elementy przynoszące korzyści krajowej gospodarce.

Literatura

1. Akane A., Shiono H., Matsubara K., Nakahori Y., Seki S., Nagafuchi S., Yamada M., (1991), *Forensic Science International*, 49, 81-88.
2. Buitkamp J., Epplen J. T., (1996), *Electrophoresis*, 17, 1-11.
3. Callesen H., Liboriussen T., Greve T., (1996), *Animal Reproduction Science*, 452, 215-226.
4. Daneau I., Houde A., Ethier J-F., Lussier J. G., Silversides D. W., (1995), *Biology of Reproduction*, 52, 591-599.
5. Dymnicki E., Oprządek J., Reklewski Z., Sakowski T., (1996), *Animal Science Papers and Reports*, 14, no. 2, 111-119.
6. Egen A., Fries R., (1995), *Animal Genetics*, 26, 215-236.
7. Ennis S., Gallagher T. F., (1994), *Animal Genetics*, 25, 425-427.
8. Galli C., Lazzari G., (1996), *Animal Reproduction Science*, 42, 371-379.
9. Gibbson C. W., Golub E. E., Abrams W. R., Shen G., Ding W., Rosenbloom J., (1992), *Biochemistry*, 31, 8384-8388.
10. Grzybowski G., (1996), *Przegląd Hodowlany*, 8, 37-39.
11. Grzybowski G., (1997), *Prace i Materiały Zootechniczne*, 50, 41-67.
12. Grzybowski G., Lubieniecki K., Reklewski T., Grzybowski T., Woźniak M., Miścicka-Słiwka D., (1996), *17th Genetical Days*, Brno, Česká Republika, Book of Abstracts, 50-51.
13. Hawkins J. R., (1993), *Trends Endocrinol Metab*, 4, 328-332.
14. Jafar S. I., Flint A. P. F., (1996), *Theriogenology*, 46, 191-200.
15. Johnson L. A., Cran D. G., Polge Ch., (1994), *Theriogenology*, 41, 51-56.
16. Kawarsky S. J., Parvathi K. B., Stubbings R. B., Hansen P. J., King A. W., (1996), *Biology of Reproduction*, 54, 53-59.
17. Kimpton C. P., Oldroyd N. J., Watson S. K., Frazier R. R. E., Johnson P. E., Millican E. S., Urquhart A., Sparkes B. L., Gill P., (1996), *Electrophoresis*, 17, 1283-1293.
18. Koopman P., (1995), *Reproduction Fertility and Development*, 7, 713-732.
19. Koopman P., Gubbay J., Vivian J. G., Goodfellow P., Lovell-Badge R., (1991), *Nature*, 351, 117-121.
20. Lange W., Pemsel H., Blottner S., Roselius R., Pfeilsticker J., Rommel P., (1995), *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 38, 2, 155-161.
21. Lau E. C., Mohandas T. K., Shapiro L. J., Slavkin H. C., Snead M. L., (1989), *Genomics*, 4, 162-168.
22. Lohuis M. M., (1995), *Theriogenology*, 43, 51-60.
23. McElreavey K., Barboux S., Ion A., Fellous M., (1995), *Heredity*, 75, 599-611.
24. Miścicka-Słiwka D., Woźniak M., Grzybowski T., (1996), *Proc. of the 14th meeting of the International Association of Forensic Sciences*, (IAFS), 26-30 August 1996, Tokio (in press).
25. Ng A., Sathasivam K., Laurie S., Notariani E., (1996), *Animal Reproduction Science*, 41, 131-139.
26. Pawłowski R., (1993), *Zastosowanie reakcji łańcuchowej polimerazy DNA (metoda PCR) do ustalania płci osobnika na podstawie badania DNA izolowanego ze śladów biologicznych*, rozprawa habilitacyjna, Akademia Medyczna, Gdańsk, 184.
27. Peippo J., Huhtinen M., Kotilainen T., (1995), *Theriogenology*, 44, 619-627.
28. Pfeffer M., Wiedmann M., Batt C. A., (1995), *Veterinary Research Communications*, 19, 375-407.
29. Promega Corp., (1995), *GenePrintTM Fluorescent STR and sex identification systems*, Gene Analysis, 1-4.
30. Ramkisson Y., Goodfellow P., (1996), *Current Opinion in Genetics and Development*, 6, 316-321.
31. Reklewski Z., Dymnicki E., (1994), *Zeszyty Naukowe AR*, Wrocław, 245, 57-66.
32. Reklewski T., Grzybowski G., Lubieniecki K., (1996), *17th Genetical Days*, Brno, Česká Republika, Book of Abstracts, 52-53.

33. Saberivand A., Outteridge P. M., (1996), *Immunology and Cell Biology*, 74, 109-120.
34. Sathasivam K., Kageyama S., Chikuni K., Notariani E., (1995), *Animal Reproduction Science*, 38, 321-326.
35. Veerhuis R., Hendriksen P. J. M., Hengst A. M., Kruijt L., Tieman M., Booman P., (1994), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 42, 317-330.
36. Vriz S., Griffiths B. L., Harley V., Goodfellow P., Lovellbadger R., (1996), *Biochemistry and Molecular Biology International*, 37, 1137-1146.
37. Wayda E., Plucienniczak G., Jura J., Plucienniczak K., Kańska L., Skrzyszowska M., Smoraż Z., (1995), *Medycyna Weterynaryjna*, 51(9), 530-532.
38. Willard H. F., (1995), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Eds. Scriver C. R., Beaudet A. L., Sly W. S., Valle D., McGraw-Hill, Inc., 16, 719-737.
39. Womack J. E., Shrinivas R. K., (1995), *Current Opinion in Genetics and Development*, 5, 725-733.

Methods and the economic importance of controlling sex proportions in cattle

Summary

Attending animals of only one sex, depending on the chosen type of production, would considerably increase its effectivity. The problem of sex determination is an element of crucial importance in biotechniques of unconventional reproduction. In the case of cattle it gained importance with the development of breeding programmes based on multiple ovulation and embryo transfer (MOET). The control of proportions between sexes may be obtained either through separation (sorting) of spermatozoa subpopulations carrying chromosome X or Y, or by determining the sex of embryos (known as sexing) prior to their transfer to the uterus of the recipient cow. The current possibilities of sorting viable sperm are highly unsatisfactory for the needs of artificial insemination. Thus, for the sex preselection DNA techniques are being introduced, using the latest results on sex determining region Y (SRY) and on polymorphism of the gene of amelogenine.

Introducing embryo-sexing into breeding programmes for cattle would result in considerable profits for the countries' economy. For instance, the annual genetic progress as regards milk production would reach 3 kg on the dam-son path and as much as 44 kg on the dam-daughter path.

Key words:

sex determination, sex preselection, embryo sexing, genetic improvement, cattle.

Adres do korespondencji:

Grzegorz Grzybowski, Zakład Immunogenetyki, Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, Jastrzębiec, 05-551 Mroków.