

Лекція №9.

Тема лекції: Селекція ембріонів за статтю (2 год.)

План

- 1. Детермінація і диференціація статі.**
- 2. Регуляція співвідношення статей шляхом розділення Х- та Y-спермій.**
- 3. Оцінка і селекція ранніх ембріонів за статтю.**

Отримання тварин визначеної статі – це проблема практична і біологічна. Це важливо для молочної худоби, у якої молочна продуктивність відноситься до ознак, обмежених статтю.

У соматичних клітинах телиці чи корови міститься 58 аутосом і дві Х-хромосоми, а в соматичних клітинах бика – 58 аутосом, одна Х-хромосома і одна Y-хромосома. Корови мають хромосоми ХХ, бики ХY. Решта хромосом і аутосом у тварин різних статей однакові. Статеві хромосоми відрізняються від аутосом за формою, розмірами та структурою. Їх легко ідентифікувати і відокремити від аутосом.

У ссавців гонади закладаються в онтогенезі однаковими у особин різних статей. За відсутності в ядрі клітини Y-хромосоми недиференційовані гонади ембріона розвиваються в яєчники. Якщо в наборі хромосом раннього ембріона є Y-хромосома, то гонади розвиваються в сім'яники. Вміщені в Y-хромосомі гени необхідні для сперматогенезу.

Під *диференціацією статі* розуміють процес розвитку, який призводить до різниці між організмом самця та самки в ході онтогенезу (індивідуального розвитку організму). Статева диференціація визначає анатомічну, фізіологічну та біохімічну організацію особини. Статеві відмінності стосуються внутрішніх та зовнішніх органів розмноження, зовнішньої морфології особини, складних актів поведінки, обміну речовин, гормональної діяльності, тривалості життя та ін.

Розрізняють первинні та вторинні статеві ознаки. До первинних статевих ознак відносять ті морфологічні і фізіологічні особливості організму, які забезпечують утворення гамет та поєднання їх у процесі запліднення, а також відмінності у будові внутрішніх та зовнішніх органів розмноження. Первинні статеві ознаки визначаються при заплідненні та в ембріональному періоді – до 8-го тижня включно після запліднення. Їх розвиток продовжується в плодному періоді (починаючи з 9-го тижня) та після народження.

Після народження та до завершення статевого дозрівання формуються вторинні статеві ознаки. До вторинних статевих ознак відносять ознаки та властивості організму, які безпосередньо не забезпечують процеси гаметогенезу та запліднення, але відіграють роль у статевому розмноженні.

Статеве диференціювання ембріонів сільськогосподарських тварин починається з утворення гонад.

У ембріонів раннього періоду статеві залози представлені генітальними валиками, які ще не містять статевих клітин. Первинні статеві клітини (гоноцити) утворюються в жовтковому мішку ембріона близько 25-го дня ембріонального розвитку і на 30-й день амебоїдними рухами вони мігрують в генітальні валики, з яких потім розвиваються статеві залози. Залежно від того, в яку частину генітальних валиків (периферичну чи центральну) вони проникають, розвивається яєчник чи яєчко. Міграція гоноцитів в периферичну чи центральну частину генітального валика визначається геном SRY Y-хромосоми, який відноситься до родини ДНК-регуляторних генів Sox.

На ранніх стадіях розвитку ембріона генітальний тракт формується з індиферентних (однакових для обох статей) структур: мюллерових та вольфових проток, що впадають в сечостатевий синус. З кожної з них формуються внутрішні статеві органи. Сечостатевий синус утворює структури, з яких формуються зовнішні статеві органи.

При розвитку жіночої статевої системи вольфові протоки регресують, а з мюллерових – утворюються фаллопієві труби, матка та верхня частина піхви. Сечостатевий синус дає початок клітору, малим та великим статевим губам.

При формуванні чоловічої статеві системи регресують мюллерові протоки, а вольфові – диференціюються в сім'явиносну протоку, сім'яні міхурці та придаток яєчка. З сечостатевого синусу розвивається статевий член, калитка та передміхурова залоза.

Стать тварини визначається такими компонентами: набором статевих хромосом, генеративними елементами гонад, вмістом в організмі статевих гормонів, вторинними статевими ознаками, внутрішніми та зовнішніми статевими органами, статевою поведінкою. Якщо який-небудь з компонентів статі у суб'єкта не відповідає усім іншим, його можна віднести до групи гермафродитів.

Детермінація забезпечує утворення рівної кількості самців і самок, що необхідно для нормального самовідтворення виду. Типи: 1) *епігамний* – стать особини визначається в процесі онтогенезу, залежить від зовнішнього середовища. 2) *прогамний* – стать визначається в ході гаметогенезу у батьків особини. 3) *сінгамний* – стать визначається в момент злиття гамет.

Первинне і вторинне співвідношення статей: співвідношення статей, яке визначається в момент злиття гамет, називається первинним, завжди 1:1. Будь-яка зміна в співвідношенні статей, як до, так і після народження, називається вторинним. Зазвичай після народження воно зміщується на користь жіночої статі, тому у багатьох видів тварин і в людей чоловічих особин народжується більше, ніж жіночих: кролики – 57 %, людина – 51 %, птиці – 59 %.

2. Регуляція співвідношення статей шляхом розділення X- і Y-спермій.

Регулювання співвідношення статей у популяції статей можливо лише з використанням біотехнологічних методів. У молочному скотарстві найбільш важливе господарське значення мають корови. При розведенні порід м'ясного напрямку найбільш економічно вигідним є вирощування бугайців. Кінцевою метою селекції за статтю є народження у стадах молочного напрямку тільки телиць, а у стадах м'ясних порід – тільки бугайців.

Проблема регулювання статі: має важливе господарське значення. Наприклад: в молочному скотарстві, у яєчному птахівництві бажані самки, а там, де основний продукт – м'ясо, краще самці. Проблема в тому, щоб розділити сперму на X- і Y-фракції.

Б. Бхаттахарія (1962) провів експеримент, виходячи з гіпотези, що спермії з X-хромосомою на основі їх високої маси будуть швидше осідати, ніж спермії з Y-хромосомою. Для цього він використовував *метод седиментації*. Цим методом він розділив сперму самця кролика на дві фракції – верхню і нижню, які і використовував для осіменіння двох груп кролиць. Осіменіння кролиць спермою з верхньої фракції призвело до народження високої частки самців (27:7), а з нижньої фракції-самок (27:11). Спермії бика вдалося розділити методом конвекційної седиментації.

Е. Schilling (1976) провів центрифугування сперми самця кролика, використовуючи градієнт щільності в глюкозо-жовтково-цитратному середовищі з 3-12 % лактозою. Час центрифугування сперми становив 15 хв при 1000 об/хв при температурі 20 °С. В результаті осіменіння кролиць спермою з верхньої фракції було отримано 58,6 % самців, а з нижньої фракції – 40,1 %. Повторне центрифугування сперми не привело до розширення зсуву в співвідношенні статей у потомстві.

Відтворення цієї методики іншими авторами не дало позитивних результатів .

Поділ спермійів за допомогою електрофорезу. В електричному полі чоловічі гамети з Х-і Y-хромосомами несуть різні заряди.

Тому за допомогою електрофорезу можна розділити спермії на дві генетично різні частини, що зумовлюють детермінацію статі. Встановлено, що спермії кролика з Х-хромосомою в процесі електрофорезу прямували до анода, а спермії з Y-хромосомою — до катода. Після штучного осіменіння самок спермিয়াми, що перебували у анода, в потомстві народжуються самки, а при заплідненні спермিয়াми, що перебували у катода, — самці.

Метод ф і л ь т р а ц і ї. R. Ericsson і D. Langvein (1973) розробили метод поділу сперміїв з Х-і Y-хромосомами шляхом фільтрації.

Як середовище, в якій відбувається поділ, використаний бичачий сироватковий альбумін. В основі методу лежить різна рухливість спермій з різними статевими хромосомами. Так, більш легкі спермії з Y-хромосомою володіють більшою рухливістю і швидше проходять через в'язкий шар альбуміну. Автори використовували вертикальну колонку з трьома шарами, причому концентрація бичачого сироваткового альбуміну збільшувалася зверху вниз. За допомогою забарвлення спермій акрихіном було встановлено, що нижня фракція містила до 85 % спермій з статевої Y-хромосомою.

Імунологічні методи. Ці методи були розроблені, коли в 1951 р. був виявлений Н-Ү-антиген, генетично детермінуючий Ү-хромосому. Цей антиген був надалі використаний для отримання специфічної імунної сироватки. Передбачалося, що ця сироватка буде пошкоджувати в еякуляті самців сперміїв з Ү-хромосомою.

До перспективних методів поділу сперміїв відноситься **використання лазера**. Встановлено, що спермії з Х-хромосомами містять більше ДНК, ніж спермії з Ү-хромосомами, а позитивні або негативні заряди клітин залежать від кількості ДНК.

При використанні лазера спермії спочатку проходили флюоресцентну обробку, після чого їх пропускали через лазерний промінь і під впливом негативно і позитивно заряджених пластин вони відхилялися у відповідну сторону. Цю технологію рекомендується перевірити для розділення Х-і Y-сперміїв бугая.

3. Оцінка і селекція ранніх ембріонів за статтю.

Цитогенетичні методи визначення статі ембріонів.
Відомі два методи визначення статі ембріона: ***ідентифікація статевого хроматину та аналіз набору статевих хромосом в клітинах трофобласта.*** Статевий хроматин можна виявити в трофобласті за допомогою біопсії у ембріонів, що знаходяться на стадії ранньої морули. Діагностика статі цим методом недостатньо надійна. Найбільше поширення отримав ***метод аналізу статевих хромосом.*** При використанні цього методу необхідно, щоб клітини ембріона перебували на стадії метафази. На метафазних клітинах трофобласта ембріона можна чітко ідентифікувати статеві хромосоми.

Вперше прямий метод визначення статі за допомогою цитогенетичного аналізу хромосом був успішно застосований на 12-15-добових ембріонах великої рогатої худоби в 1976 р. Ембріони перебували на стадії бластоцисти. При визначенні статі цим методом брали шматочок тканини трофобласта без пошкодження внутрішньої клітинної маси і готували препарати – метафазні пластинки з цих клітин. Після відділення частини тканини трофобласта ембріони були пересаджені реципієнтам і в результаті в 66 % випадків отримані телята бажаної статі. Пізні бластоцисти, стать яких вдається визначити, малопридатні для трансплантації.

У нашій країні у ВНДІ тваринництва розроблений **цитогенетичний метод**, що дозволяє визначити стать ембріонів великої рогатої худоби у віці двох і менш тижнів.

Послідовність маніпуляцій при використанні методу наступна: мікробіопсію трофобласта, короткочасне культивування *in vitro* клітин трофобласта, приготування препаратів хромосом, хромосомний аналіз, короткочасне зберігання ембріона після мікробіопсію тканини трофобласта. Встановлено, що мікробіопсію може бути ефективно виконана на 9-15-добових ембріонах.

Препарати хромосом забарвлюють за загальноприйнятим методом Гімза протягом 5 хв, а потім по наявності різних типів статевих хромосом визначають стать ембріона.

Імунологічні методи визначення статі. На поверхні клітин ембріонів-самців знаходяться специфічні білки Н-Ү-антигени, які відсутні в клітинах ембріонів-самок. Це пояснюється тим, що гени цих білків локалізовані в локусі Ү-хромосомах. Н-Ү-антигени є маркерами чоловічої статі ембріона. Можна встановити присутність Н-Ү-антигена у 6-12-добових ембріонів великої рогатої худоби за допомогою флюоресцуючих моноклональних Н-Ү-антитіл. У ембріонів після такої маніпуляції визначають хромосомний набір – ХХ і ХҮ. Доведено, що ембріони чоловічої статі фарбуються за допомогою флюоресцуючих моноклональних антитіл проти Н-Ү-антигена, продукуемого геном Н-Ү.

За допомогою розробленого у 1986 році французькими вченими нового зонда ДНК можна визначити Y-хромосому у ембріонів великої рогатої худоби. Для хромосомного аналізу у 6-добового ембріона беруть близько 10 клітин. Така мікрохірургія не позначається на життєздатності ембріонів. Витягнуті з трофобласта ембріона клітини розмножуються в культуральному середовищі *in vitro*. Отримавши при культивуванні *in vitro* достатню кількість клітин, можна надійно по наявності або відсутності Y-хромосоми визначити стать ембріона ще до його трансплантації.