

MEMELİLERDE CİNSİYET ORANININ DEĞİŐTİRİLMESİ (DERLEME)

Alteration of the Sex Ratio In Mammals (A Review)

İlker SERİN¹

¹ Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın.

ÖZET

Memelilerin erkekleri her bir diploid hücrede bir X ve bir Y kromozomuna (XY) sahip iken dişileri iki adet X kromozomu (XX) taşır. Spermatogenezisin sonlarında eşey hücrelerinin mayotik bölünmeye uğramasıyla orijinal genetik materyalin yarısına sahip haploid yapıdaki spermatidler oluşur. Bu olay sonucunda hücrelerin yarısı Y kromozomuna yarısı ise X kromozomuna sahip olurlar. Cinsiyet, spermatozoonun taşıdığı bu cinsiyet kromozomları tarafından fertilizasyon esnasında ovidukt'ta belirlenir.

Cinsiyet oranını kontrol eden herhangi bir uygulama hayvancılıkta genetik kapasitenin ilerlemesine güçlü bir etki yapar. Cinsiyetin kontrol edilmesinde en etkili yöntemlerden birisi X kromozomu taşıyanlarla Y kromozomu taşıyan spermatozoonların ayrılmasıdır. Bu ayrım farklı kromozom yapısına sahip spermatozoonlar arasında mevcut olan kütle, motilite, yüzey elektrik yükü, DNA miktarları ve antijenik yapı gibi farklılıklarının belirlenmesi ile yapılabilmektedir.

Anahtar kelimeler: Sperma, cinsiyet seçimi, X ve Y kromozomu.

SUMMARY

In mammals, the male having an X- and a Y-chromosome (XY) and the female a complement of two X-chromosomes in each diploid cell (XX). During late spermatogenesis, the germ cells undergo a final meiotic division, resulting in spermatids containing only half of the original genetic complement. As a result of this event, half of the spermatozoa contain a single Y and other half a single X chromosome. The genetic sex is determined in the oviduct at the time of fertilization and the sex of the offspring is determined by the sex chromosome within the spermatozoa.

Any method influencing the sex ratio would be a strong stimulus to genetic progress in animal husbandry. The most elegant method of achieving such an alteration is the separate spermatozoa into X- and Y-chromosome bearing fractions. This has been attempted by exploiting differences in mass, motility, surface charge, DNA content and surface antigenic structure between X- and Y-bearing spermatozoa.

Key words: Semen, sex preselection, X and Y spermatozoa

GİRİŞ

Yavrunun cinsiyetinin insanların isteklerine uyar şekilde yönlendirilmesi, başka bir deyimle doğacak yavruların cinsiyetinin kontrol altına alınmak istenmesi çok eski bir arzunun sonuçları olarak ortaya çıkmaktadır. Yazılı tarihin başlangıcından beri insanoğlunun dikkatini çeken ve ampirik yöntemlerle başlayan bu süreç günümüzde oldukça gelişmiş yöntemlerle devam etmesine rağmen daha uzun bir zaman bilim adamlarını meşgul edecek görünmektedir. Geçmişte kullanılan yöntemlere bakıldığında hemen tamamının cinsiyeti dış etkenlerin belirlediği inancı ile yapıldığı görülmektedir. Cinsiyetin döllenme esnasında erkek gameti olan spermatozoon tarafından belirlendiğinin anlaşılmasından sonra çalışmalar bu hücrelerin *in vitro* ya da dişi genital kanalında iken seçilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (18,22).

CİNSİYETİN OLUŞUMU

Testis parenşiminde yer alan seminifer tubullerin duvarında başlıca iki tür hücre ayırt edilir. Bunlardan birincisi sertoli hücreleri, diğeri ise çoğalma yeteneğine sahip germinatif hücrelerdir. Erken embriyonik evrede saccus vitellinusdan köken alan primordiyal germinatif hücreler fetal gonadların oluşumundan sonra birkaç bölünme geçirerek gonositlere, bunlar da farklılaşarak erginlikten hemen önce spermatogoniumlara dönüşürler. Mitoz bölünme ile sayıları artan spermatogoniumlar kromozom sayıları $2n$ yani diploid olan ve bu durumlarıyla soma hücrelerine benzeyen

primer spermatositleri oluştururlar. Bu hücrelerin daha sonra mayoz bölünme geçirmeleri ile orijinal genetik materyalin yarısına sahip olan spermatidler oluşur. Haploid yapıdaki bu hücrelerde kuyruk da gelişerek morfolojik gelişme tamamlanır ve tam olarak oluşumunu tamamlamış hücreler seminifer tübüllerin lümenine verilerek epididimise nakledilirler (5,13,18).

Bağlı oldukları tür ne olursa olsun tüm memelilerde ergin erkek ve dişilerin meydana getirdikleri gametler cinsiyet kromozomları bakımından farklıdır. Kromozomların yarıya inmesinden (redüksiyon) önce dişilerdeki oogoniumlar XX , erkeklerdeki spermatogoniumlar ise XY diploid cinsiyet kromozomludurlar. Redüksiyon ile dişilerin ovumu yalnız X taşıırken, erkeklerin spermatozoidlerinin yarısı X , yarısı da Y kromozomuna sahip olurlar. Spermatozoonun ovuma penetrasyonunu ile gerçekleşen gametik füzyondan sonra diploid ($2n$) kromozomlu yapı yeniden oluşur. Sonuçta ovum Y taşıyan spermatozoon tarafından döllenmişse erkek, X taşıyan spermatozoon tarafından döllenmişse dişi yavru meydana gelir. Böylece doğacak yavruların cinsiyeti döllenme anında ve erkek gametinin taşıdığı cinsiyet kromozomunun etkisi ile yumurta kanalında belirlenmiş olur (18). Memelilerde Y kromozomunun bu etkisini küçük bir segmenti üzerinde taşıdığı 'testis belirleyici faktör geni' aracılığı ile yaptığı ve bu genin primitif gonadların testis olarak gelişmesini sağladığı belirlenmiştir (17).

Günümüzde cinsiyetin kontrol altına alınabilmesi için iki temel yaklaşım uygulanmaktadır. Birincisi spermanın X ya da Y kromozomu taşıyan spermatozoonlardan zengin fraksiyonlara ayrılarak bu spermalarla suni tohumlama veya *in vitro* fertilizasyon, ikincisi ise implantasyondan önce embriyoların cinsiyetini belirleyerek arzu edilen cinsiyetteki embriyoların taşıyıcı annelere transferinin yapılması şeklindedir (1,13).

CİNSİYET SELEKSİYONUNUN YARARLARI

Cinsiyet oranına etki eden herhangi bir uygulamanın hayvan yetiştiriciliğinde genetik kapasitenin hızlı yükselmesine yapacağı katkının yanında birçok hayvan türünde büyük bir ekonomik avantaj sağlayacağı açıktır. Arzu edilmeyen birçok özelliğin yanında cinsiyete bağlı lethal genlerin, genetik hastalıkların elimine edilmesi ve kontrolü konuya olan ilgiyi arttırmıştır (8). Anaç sürülerindeki eksikliklerin tamamlanması, sürünün sürekliliğinin sağlanması, sürülerin genç dişilerle yenilenmesi gibi nedenlerle dişi yavruların arzu edildiği hallerde de cinsiyet seleksiyonu büyük kolaylıklar sağlayacaktır. Hayvan ıslahında en iyi genetik yapıya sahip olanlardan mümkün olduğunca fazla erkek yavru elde ederek bunlardan suni tohumlamada kullanılacak kaliteli spermanın elde edilmesi büyük bir ekonomik yarar getirecektir. Genetik kapasitenin hızlı artışına olan katkılarından başka tek cinsiyette yoğunlaşmış sürülerin idaresindeki kolaylık, örneğin sütçü ırklardan

yalnız dişi, etçi ırklardan ise yalnız erkek yavruların alınması bakım ve beslemenin yanında pazarlamada da büyük bir kolaylık sağlayacaktır (13,14,18).

İnsanlarda ise durum biraz daha farklıdır. Ekonomik ve sosyal durumu iyi toplumlarda bile aynı cinsiyette iki veya daha fazla çocuğu olan ebeveynlerin genelde karşıt cinsiyette çocuk istedikleri görülmektedir. Sosyal ve kültürel tercihler nedeniyle erkek çocuğun kızdan daha önemli olduğunu savunan toplumların bulunması, erkek çocuk doğurmayan kadınların bu nedenle defalarca hamile kalması birçok olumsuz etkinin yanında anormal nüfus artışını da beraberinde getirmektedir (7).

X VE Y KROMOZOMU TAŞIYAN SPERMATOZOONLARIN AYRILMASI

Spermada X ve Y taşıyan spermatozoonların ayrılması iki hücre arasında temelde bazı farkların bulunması esasına dayanmaktadır.

1. Fiziksel Farklılıklara Bağlı Ayırım

X kromozomu Y kromozomuna göre daha fazla DNA içermektedir. DNA miktarları bakımından türlere göre ortalama %3-4 olan bu farkın spermatozoonlar arasında birtakım fiziksel ayrılıklara neden olduğu bildirilmektedir (15). Ancak meydana gelebilecek biçim, büyüklük ve ağırlık gibi fiziksel farklılıkların ortaya çıkarılması ve tespiti çok duyarlı ölçüm araçlarını

gerektirmesi nedeniyle pratikte kullanılmaları oldukça zordur (22).

X ve Y taşıyan spermatozoonlar arasında yapılan sedimentasyon tekniklerinin temelini bu farklar oluşturmaktadır. X taşıyan spermatozoonun Y den daha ağır olması, bir yoğunluk kolonunda (Örneğin Percoll) daha hızlı bir çökme hızına sahip olmasını sağlamak ve böylece kolonunun daha alt kısımlarında toplanmasına yol açmaktadır (11).

Her iki spermatozoon arasında motilite hızı, mediumda yüzmeye şekilleri, farklı yoğunluktaki ortamlara penetrasyon yetenekleri bakımından da farklılıklar olduğu bilinmektedir. Bu farkların ortaya çıkarılması için değişik yöntemler kullanılabilir.

Farklı yoğunluklarda tabakalandırılmış Serum Albümini üzerindeki spermada, Y kromozomu taşıyanların X taşıyanlardan ayrıldıkları gözlenmiştir. Albümin kolonunda spermatozoonların ayırımının mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak sonuçlara bakılırsa daha viskoz ve yoğun sıvılara kolay penetre olabilme yeteneği sayesinde bu ortamda Y taşıyanın X taşıyandan daha hızlı hareket ettiği söylenebilir. Albümin kolonunda artan yoğunluk ve viskozitenin Y taşıyan spermatozoonun yüzmeye kabiliyetini ve motilitesini arttırdığı düşünülmektedir (4,6). Bazı araştırmacılar (2) benzer yöntemle yaptıkları ayırım işleminin başarılı olmamasını türler arasındaki motilite ya da hücrelerin yüzey

karakterlerindeki farklılıklara bağlanmaktadır.

Daha önce ölü ve hareketsiz insan spermatozoonlarının elimine edilmesi için kullanılan Laminar Flow tekniği modifiye edilerek X ve Y taşıyan spermatozoonlarının ayırımı için de kullanılmaya başlanmıştır. Yöntemin temelini Y taşıyan spermatozoonun X taşıyandan farklı şekilde ve daha hızlı yüzmesi oluşturmaktadır. Hareketsiz bir mediumda canlı spermatozoonlar tipik olarak bir eğri çizerek hareket ederken eğer mediumda bir akıntı oluşturulacak olursa hızları değişmemekle beraber X taşıyan spermatozoa Y taşıyandan daha doğrusal bir yörünge çizerek hareket etmektedir. Yöntem özel olarak geliştirilmiş silindirik bir kolon yardımıyla yapılmaktadır (1,9,13).

Sephadex Gel Filtrasyon tekniğinde filtreden geçen spermatozoonların çok az miktarında Y kromozomu belirlenirken çoğunun X kromozomunu taşıdığı belirlenmiştir. Bu yöntemle ayrıca motilitede artış gözlenirken anormal morfoloji gösteren spermatozoonların ayırımı da yapılabilmektedir. Klinik olarak kullanılabilen bu yöntem X taşıyan, başka bir ifadeyle dişi yavru oluşturacak spermatozoonların ayırımının yapılabildiği bir tekniktir (1,6,3)

2. pH Duyarlılığına Bağlı Ayırım

Değişik pH değerlerinde X ve Y taşıyan spermatozoonların yaşama yeteneklerinin göreceli olarak etkilendiği bildirilmek-

tedir. Buna göre spermatozoonlardan birinin asit ortamda diğerinin de alkali ortamda daha aktif olduğu ve dolayısı ile ovumu dölleme şansının arttığı varsayımına dayanmaktadır. Ancak bu konuda yapılan araştırmalarda tatmin edici sonuçlar alınamamıştır (18).

3. Yüzey Elektriksel Yük Farklılığına Bağlı Ayırım

X ve Y taşıyan spermatozoaların plazma membranlarında farklı elektrik yükü taşıdıkları ya da net elektrik yükleri arasında farklılık olduğu bilinmektedir. Net elektrik yükündeki bu farklılığın plazma membranında daha fazla sialik asit taşıyan spermatozoonun daha fazla negatif elektrik taşımasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Deney öncesi spermanın sialidaz ile muamelesinin elektroforetik ayırımı engellemesi bu görüşü desteklemektedir (1,5). Elektriksel bir alana maruz bırakılan spermatozoonlar net elektrik yüklerindeki ve motilitelerindeki farklılığa bağlı olarak iki fraksiyona ayrılabilirler (8,10).

Bu yöntemde tatmin edici sonuçlar alınmasına rağmen araştırmacılar arasında farklı sonuçlar alındığı görülmektedir. Bu durum X ve Y kromozomlarının her zaman 'elektriksel yük farklılık belirleyici faktörü' şifrelemediği ve bu yüzden tüm spermatozoonlar arasında her zaman elektriksel yük farklılığının olmadığı ya da meydana gelen farkın belirlemeyecek kadar küçük olduğu sonucunu akla getirmektedir. Elektroforetik ayırımı yapılan spermatozoonlarda gözlenen motilite düşük-

lüğü bu teknikte karşılaşılan diğer önemli bir problem olarak görülmektedir (8,9).

4. Yüzey Antijenik Yapı Farklılığına Bağlı Ayırım

H-Y antijeni adı verilen ve glikoprotein tabiatındaki bir maddenin Y kromozomu ile ilişkili olarak bulunduğu ve birçok memeli türünün erkeklerinin eritrositler ve premayotik germ hücreleri hariç tüm hücrelerinde bulunduğu saptanmıştır. Sertoli hücreleri tarafından da salgılanan bu maddenin spermatozoonlarda da varlığı belirlenmiştir. Embriyonal hayatta gonadların testise farklılaşmasında rol oynadığı bilinen bir genin Y kromozomunun sentromerine yakın bir alanda lokalize olarak bu antijenin varlığından sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan immunohistokimyasal çalışmalarda spermatozoonların yaklaşık %50 sinin bu antijeni taşıdıkları ve bunun da postakrozomal bölge ile kuyruğun orta kısımlarında lokalize olduğu belirlenmiştir. HY antijeninin Y kromozomu taşıyan spermatozoon ile sınırlı kalması spermanın bu özelliğe dayanarak HY⁺ ve HY⁻ şeklinde iki popülasyona ayrılabilceğini akla getirmiştir. Bu konudaki ilk başarılı çalışmalar fare ve insan spermasında elde edilmiştir. HY antijenine karşı oluşturulan antikor duyarlılık kolonunda öncelikle HY⁺ Y spermatozoa kalırken kolonun gerisine geçen spermanın X bakımından zenginleşmiş olduğu görülmüştür (5,20).

5. DNA Miktarlarındaki Farklılığa Bağlı Ayırım

Ekonomik önemi olan birçok hayvan ve insan spermasında yavrunun cinsiyetini belirleyen kromozomların ayırımını, sahip oldukları DNA miktarlarına göre yapabilen yöntemler geliştirilmiştir (6).

Flow sitometri bir populasyondaki spermatozoonların hem analiz edilebildiği hem de değişik flüoresan boyalarla boyanmalarına göre ayırımlarının yapılabildiği bir tekniktir. Spermatozoonların yaşama kabiliyetleri, DNA yapıları ve populasyondaki akrozom reaksiyonuna uğramış spermatozoonların oranı gibi suni tohumlama uygulamalarında başarıyı etkileyen birçok özelliğin yanında spermatozoonların X ve Y taşıyan alt gruplara ayrılmasında da kullanılmaktadır. Yöntemin esasını spermatozondaki kromatinlerin DNA spesifik flüoresan boyalarla boyanması ve boyanan spermatozoonların özel bir cihaz içinden geçirilerek aldıkları boya miktarlarına göre fraksiyonlara ayrılması teşkil eder. X kromozomunun Y den daha büyük olması ve dolayısı ile alacağı boyanın daha fazla olması ayırım işleminin temelini oluşturmaktadır. Oldukça etkili bir yöntem olmasına rağmen ayırımı yapılan spermatozoonlarda yaşama ve dölleme yeteneğinin düşmesi, yüksek maliyet, kullanılan boyaların sebep olduğu mutajenik etki gibi olumsuz tarafları vardır (7,14).

AYIRIMIN ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ

Cinsiyetin önceden belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda etkinliğin

belirlenmesi büyük önem taşır. Bu amaçla kullanılan başlıca yöntemler şunlardır.

1- Yavrunun Cinsiyetinin Belirlenmesi: Yavruların doğumu beklenecek ayırım yapılmış spermayla gerçekleşen tohumlamaların sonuçları belirlenebilir. Ancak bu yöntemde spermadaki X:Y oranı tam olarak belirlenemez. Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi için çok sayıda hayvan üzerinde çalışılması ve doğuma kadar karar verilememesi nedeniyle bu yöntem günümüzde terk edilmiştir. Alternatif olarak gebelik süresi daha kısa ve daha çok yavru veren laboratuvar hayvanlarının kullanılması, bunlardan elde edilen sonuçların diğer türleri ne kadar etkileyeceği bilinemeyeceğinden şüphelidir (22).

2- Embriyonun cinsiyetinin belirlenmesi: İstenilen cinsiyette yavru elde edebilmenin ya da ayırımın etkinliğinin belirlenmesinin diğer bir yolu da embriyoların cinsiyetinin belirlenmesidir. Bu yolla istenmeyen cinsiyetteki embriyoların eliminasyonu sağlanarak istenilen cinsiyetteki embriyoların transferi gerçekleştirilebilmektedir. Bu amaçla kullanılan bazı yöntemler şunlardır.

a- Sex kromozomlarının analizi:

Cinsiyetinin belirlenmesi amacı ile blastosist döneminde embriyodan blastomerler alınarak *in vitro* olarak kültüre edilir. Cinsiyet kromozomları mikroskopik olarak değerlendirilir. Embriyonun kromozom yapısının belirlenmesi için diğer bir yöntem de

embriyonun ikiye bölünmesi ile yapılabilmektedir. Analiz için embriyolar 7-8 günlük iken toplanır ve ilk işlem olarak ikiye bölünür, kültüre edildikten sonra boyanır ve mikroskopta incelenir. Cinsiyet tayini yapıldıktan sonra arzu edilen cinsiyetteki embriyonun diğer yarısı transfer edilir ya da istenilen zamana kadar dondurularak saklanır. Embriyoların cinsiyetini bu yolla belirlemenin embriyonun yaşama şansını düşürmesi, zaman alması, uzman personel gerektirmesi ve maliyetinin yüksek olması gibi bazı dezavantajları mevcuttur (12).

b-Karyotip Analizi: Ayırımı yapılmış bir spermatozoonun zona pellusidasi alınmış hamster oositine penetrasyonu ya da aynı türün oositine enjeksiyonu sağlanacak olursa kromatinin dekonzasyona uğradığı görülür. Son zamanlardaki çalışmaların çoğu bu yoğunlaşmış spermatozoal kromatinin tespiti esasına dayanmaktadır. Karyotipin direkt olarak görülebilmesi ve fazla zaman almaması gibi avantajları olmasına rağmen çok örnekle çalışılmasının gerekmesi bir dezavantaj olarak görülmektedir (13,19).

c.H-Y antijeninin saptanması: Erkek embriyolarında 8-16 hücreli evreden blastosist oluşumuna kadar olan evrede mevcut olan bu antijenin antikolar yardımı ile belirlenmesi embriyoların transfer öncesi cinsiyetlerinin belirlenmesinde oldukça etkili bir yöntemdir (21).

d-X kromozomuna bağlı metabolik aktivitenin belirlenmesi: Dişilerde bulunan iki X kromozomu blastosist oluşumundan sonraya kadar fonksiyon gösterirler. Bu anda kromozomlardan birisinin büyük segmenti inaktive olarak bazı gen ürünlerinin oluşmasına neden olur. Bu olay sonucunda her iki cinsiyetteki fonksiyon gösteren X materyali eşitlenir. İnaktivasyon dönemine kadar geçen dönemde diş embriyosunda erkek embriyolara nazaran iki kat fazla bulunan bu enzimlerin belirlenmesi ile embriyonun cinsiyeti tespit edilebilmektedir (13).

3- Spermada X:Y oranının belirlenmesi: X ve Y kromozomları arasında DNA yapıları bakımından farkın belirlenmesi ile yapılır (13).

DNA analizi: İnsanlar ve ruminantların X ve Y kromozomları için değişik problemler geliştirilmiştir. Bu problemler sayesinde Fluoresence in Situ Hybridization (FISH) ve Polymerase Chain Reaction (PCR) teknikleriyle bağlantılı olarak popülasyondaki X:Y oranının belirlenmesi yapılabilmektedir (5, 10, 22).

Floresan Boyama: Quinacrin türevleri insan spermatozoonlarında DNA ya bağlanarak ultraviyole ışık altında karakteristik flüoresan ışık verir. Bu ışık özellikle Y nin distal kısmında yoğunlaşır ki burası F-body olarak adlandırılır. Ancak spermatozoonların %5.6'sında iki ya da daha fazla flüoresan nokta görüldüğü ve yine bütün Y

kromozomlarında F-body bulunmadığı da bildirilmektedir (3, 8, 10).

Birçok memeli hayvan türünde insanlardakine benzer şekilde F-body bulunduğu, kontrol grubu olarak kullanılan horoz spermatozoonlarında ise bu oluşuma rastlanılmadığı bildirilmektedir. Ancak elde edilen sonuçlar teorik olarak olması gereken %50 oranına ulaşamamaktadır. Buna sebep olarak zamana bağlı olarak flüoresan ışığın azalması ve ortamdaki bazı partiküllerin incelemeyi zorlaştırması gösterilebilir. Bundan dolayı bu yöntemin herhangi bir ayırım metodunun başarısını saptamada kullanımı sınırlı kalabilmektedir (16).

SONUÇ

Spermanın, cinsiyeti belirleyen X ve Y kromozomlarını taşıyan fraksiyonlara ayrılmasının başarılı sayılabilmesi için kullanılan tekniklerin tekrarlandığında yine başarılı sonuçlar vermesi, döllenmede bir azalmaya neden olmaması, işlem sırasında en az sperma kaybına neden olması ve en önemlisi de ucuz ve kolay yapılabilir olması gerekmektedir. Ancak ne yazık ki birçok teknik günümüzde bu hususların çoğundan yoksundur. Yine şu unutulmamalıdır ki X ve Y kromozomlarının ayrılmasında elde edilen verilerin çoğu doğrulanmamıştır. Hatta en çok kabul gören tekniklerden bile elde edilen yavru sayısı oldukça sınırlı kalmıştır. Başarısız kalan birçok çalışmanın literatürlerde yer almaması da bu konudaki gerçek durumun belirlenmesini

engellemektedir. Bu metotlarla elde edilmiş az miktardaki spermanın *in vitro* fertilizasyon ya da mikroenjeksiyon yöntemleri ile birleştirilmesi ile elde edilen sonuçların daha tatmin edici olması mümkündür (9, 22).

KAYNAKLAR

1. **Amann RP** (1989) *Treatment of sperm to predetermine sex*. Theriogenology, 31 (1) 49-60.
2. **Beal WE, White LM, Garner DL** (1984) *Sex ratio after insemination of bovine spermatozoa isolated using a bovine serum albumin gradient*. Journal of Animal Science, 58 (6) 1432-1436.
3. **Beckett EA** (1989) *Selection of X-bearing sperm*. Fertility and Sterility, 42 (5) 830-835.
4. **Beernik FJ, Dmowski WP, Ericsson RJ** (1993) *Sex preselection through albumin separation of sperm*. Urology-Andrology, 59 (2) 382-386.
5. **Bradley MP** (1989) *Immunological sexing of mammalian semen: Current status and future options*. Journal of Dairy Science, 72: 3372-3380.
6. **Corson SL, Batzer FR, Alexander NJ, Schlaff S, Otis C** (1984) *Sex selection by sperm separation and insemination*. Fertility and Sterility, 42 (5) 756-760.
7. **Cran DG, Johnson LA, Miller NGA, Cochrane D, Polge C** (1993) *Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilization*. The Veterinary Record, 9: 40-41.
8. **Engelmann U, Krassnigg F, Schatz H, Schill WB** (1988) *Separation of human X and Y spermatozoa by free-flow electrophoresis*. Gamete Research, 19: 151-159.
9. **Gledhill BL** (1988) *Selection and separation of X- and Y-chromosome-bearing mammalian sperm*. Gamete Research, 20: 377-395.
10. **Ishijima SA, Okuno M, Nakahori Y, Seki S, Nagafuchi S** (1992) *Identification of X- and Y-chromosome-bearing human sperm separated by free-flow electrophoresis using Y-*

- chromosome specific polymerase chain reaction*. Biomedical Research 13 (3) 221-224.
11. **Iwasaki S, Shioya I, Masuda H, Hanada A, Nakahara T** (1988) *Sex ratio of early embryos fertilized in vitro with spermatozoa separated by Percoll*. Theriogenology, 30: 1191-1198.
 12. **Leonard M, Kirszenbaum C, Cotinot C, Chesne P, Heyman Y** (1987) *Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe*. Theriogenology, 27 (1) 248.
 13. **McEvoy JD** (1992) *Alteration of sex ratio*. Animal Breeding Abstracts. 60 (2) 97-111.
 14. **Morrel JM** (1991) *Applications of flow cytometry to artificial insemination: A Review*. The Veterinary Record, 129: 375-378.
 15. **Moruzzi JF** (1979) *Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa*. Journal of Reproduction and Fertility, 57:319-323.
 16. **Ogawa, S, Yamakawa H, Yamanoi J, Nishida S, Kano Y** (1988) *Are fluorescent bodies of Y- spermatozoa dedectable in common with mammalian species?* Theriogenology, 29 (5) 1083-1087.
 17. **Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, Brown LG** (1987) *The sex determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein*. Cell, 51: 1091-1104.
 18. **Sevinç A** (1972) *Dölerme ve Sun'i Tohumlama*. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları, Ankara, s. 94-98.
 19. **Tateno H, Mikamo K** (1987) *A chromosomal method to distinguish between X- and Y-bearing spermatozoa of the bull in zona-free hamster ova*. Journal of Reproduction and Fertility, 81: 119-125.
 20. **Utsumi K, Iritani A** (1993) *Embryo sexing by male spesifik antibody and by PCR using male specific (SRY) primer*. Molecular Reproduction and Development, 36, 238-241.
 21. **Wachtel SS** (1984) *H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio*. Theriogenology, 21: 18-28.
 22. **Windsor DP, Evans G, White IG** (1993) *Sex predetermination of X and Y chromosome-bearing sperm: A review*. Reproduction Fertility and Development, 5: 155-171.