

<https://doi.org/10.61308/FLYY9869>

Методи за сексиране на говежди ембриони

Цветелина Тодорова

Селскостопанска академия, Институт по животновъдни науки, 2230 – Костинброд, България

Кореспондиращ автор: tzvetelinata@icloud.com

Резюме: Определянето на пола на ембрионите преди трансфер има голям потенциал за животновъдната индустрия, особено при млекопроизводството, където женските телета са предпочитани, а също помага и за успеха на ембриотрансфера. Генетичният пол на индивида се определя при оплождането и зависи от това дали яйцеклетката, носеща X хромозома, е оплодена от сперматозоид, носещ Y или X хромозома. Перфектният метод за контролиране на съотношението на половете е чрез разделяне на сперматозоидите, носещи X и Y хромозома. Разработени са много методи за определяне на пола на ембрионите, но практическите методи за диагностиката му трябва да имат надежден резултат, да са прости и спестяващи време, безвредни за ембрионите, ефективни и точни. Ефектът от определянето на пола на предварително имплантирани ембриони е важен за репродукцията и феталната диагностика на животните. Определянето на пола на ембриона преди имплантиране играе роля за подобряване на ефикасността на ембриотрансфера.

Ключови думи: развъждане на животни; говеда; сексиране на ембриони; PCR

Methods for bovine embryos sexing

Tsvetelina Todorova

Agricultural Academy, Institute of Animal Science, 2230 – Kostinbrod, Bulgaria

Corresponding author: tzvetelinata@icloud.com

Citation: Todorova, Ts. (2025). Methods for bovine embryos sexing. *Bulgarian Journal of Animal Husbandry*, 62(3), 30-37 (Bg).

Abstract: Determining the sex of embryos before transfer has great potential for the livestock industry, especially in dairy farming, where female calves are preferred, and also helps with the success of embryo transfer. The genetic sex of an individual is determined at fertilization and depends on whether an X chromosome-carrying egg is fertilized by a Y chromosome-carrying sperm or an X chromosome-carrying sperm. The perfect method to control the sex ratio is by separating the X- and Y chromosomes-carrying sperm. Many methods have been developed for sex determination of embryos, but practical methods for sex diagnosis must have a reliable result, be simple and time-saving, harmless to the embryos, effective and accurate. The effect of sex determination of pre-implanted embryos is important for the reproduction and fetal diagnosis of animals. Preimplantation embryo sex determination plays a role in improving the efficiency of embryo transfer.

Keywords: animal breeding; bovine; embryo sexing; PCR

ВЪВЕДЕНИЕ

При говедата контролът на пола е от голямо практическо значение за селекционерите. Множеството производствени цели изискват

говеда от различен пол, а това изисква полева идентификация на потомството. Контролът на съотношението между половете чрез определяне на пола на предварително имплантиран ембрион би бил от полза не само по отно-

шение на аспекта на управлението, производството и програмите за развъждане на животните, но също така и при диагностицирането на генетични нарушения на пренатален етап. Сексирането на сперма е една от техниките, които изпълняват изискването, но е доста скъпа и по-малко ефективна. Определянето на пола на ембриона преди имплантиране играе роля за подобряване на ефикасността на ембриотрансфера, като позволява трансфер на желанния ембрион в зависимост от неговия пол (Sachan et al., 2020).

Има различни методи за определяне на пола на ембриона, всеки от тях със своите предимства и недостатъци. Един добър метод за определяне на пола на ембриона трябва да бъде най-малко увреждащ или най-малко да повлияе на оцеляването на ембрионите по време на замразяване или трансфер и трябва да доведе до развитие на теле с желанния пол. Методите за определяне на пола също трябва да са прости, точни, не много скъпи и да бъдат приложими при полеви условия. Има два подхода за определяне на пола на говежди ембриони: неинвазивен и инвазивен.

Методи за определяне на пола на ембрионите

Генетичният пол на зиготата, независимо дали е женски или мъжки, се определя с оплождането на яйцеклетката от сперматозоида, имащ X или Y хромозома. Прилагат се няколко процедури за определяне на пола на ембриони при селскостопански животни чрез инвазивни или неинвазивни методи, в зависимост от това дали е необходима биопсия на ембрионална клетка (Garcia, 2001). Установено е, че висока точност се постига с инвазивни методи като цитогенетичен анализ и използване на Y специфични сонди. Молекулярната биология въвежда по-бързи и надеждни техники за определяне на пола на ембриона като полимеразна верижна реакция (PCR) и флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH). Не инвазивните методи са по-малко точни, но запазват целостта и жизнеспособността на ембриона.

Инвазивните методи не поддържат целостта на ембриона и има вероятност да го увредят и повлияят на жизнеспособността му. Някои от инвазивните методи са:

1. Цитологичен метод или Кариотипиране
2. Идентифициране на полов хроматин
3. ДНК сонди, специфични за Y-хромозомата
4. Полимеразна верижна реакция (PCR)
5. Loop медирано изотермично усилване (LAMP)
6. Флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH)

1. Цитологичен метод или Кариотипиране

Цитогенетично определяне на пола или кариотипиране е анализът на геномната рамка на клетката. При домашни животни тази техника може да се използва за определяне на пола на ембриона въз основа на наличието на X или Y хромозома в митотичния геном на метафазен етап. Някои бластомерни клетки се вземат от 6-8 дневен ембрион и тяхното делене се проверява на етапа на метафазата на митозата чрез култивиране с агенти, спиращи митозата, като колхицини (Wakchaure et al. 2015). Кариотипирането също така има потенциал да открие някои груби аномалии както и анеуплоидии, дефекти, причинени от вариации в броя на хромозомите между видовете.

Предимствата на метода са, че е евтин и лесен за изпълнение, не изисква сложно оборудване, има висока точност и може да идентифицира хромозомни аномалии преди ембрионите да бъдат трансплантирани.

Недостатъци на метода са, че тази техника отнема време и е трудоемка, с ниска степен на успех поради лоша метафазна хромозомна дисперсия (Sharma et al. 2017), но също така намалява оцеляването на ембриона (Wakchaure et al. 2015).

2. Идентифициране на полов хроматин

Методът на половия хроматин за избор на пола зависи от идентифицирането на тъм-

но оцветяващо се тяло, съседно на ядрената мембрана във фиксирана клетка, наречено тяло на Бар. Образуването на тялото на Бар е резултат от инактивирането на една от двете Х-хромозоми, присъстващи в женските клетки. Кондензацията на неактивната Х хромозома в хетерохроматичния полов хроматин или тялото на Бар е уникална съставна част на женското ядро, идентифицирана през миналия век (Barr and Bertram, 1949).

Edwards and Gardner (1967) първи демонстрират, че ембрионите могат да бъдат идентифицирани по полов път чрез оценка на половия хроматин в трофобластни клетки, получени от заешки бластоцисти. При говеда, овце, кози, прасета и коне откриването на полов хроматин не е възможно поради грубата гранулирана природа на хроматина.

Предимства - лесната и бърза техника.

Недостатъци са гранулираният характер на цитоплазмата, предотвратяващ откриването на телата на Бар. Наличието и откриването на телца на Бар зависи не само от стадия на клетката, но и от процедурата за фиксиране, т.е. неправилен стадий на клетката или неподходяща процедура за фиксиране и оцветяване може да даде фалшива информация за определяне на пола на ембриона (Wakchaure et al. 2015). Друго ограничение на тази техника е, че поради необходимостта от голям брой клетки увреждането на ембриона е значително.

3. ДНК проби, специфични за Y-хромозомата

Техниката на Y-специфичната сонда включва биопсия на малък брой клетки от ембриона с протеинази за излагане на ДНК и след това хибридирана с радиоактивно белязана Y-хромозомна специфична сонда. Положителните резултати от хибридизацията показват наличието на Y-хромозома и следователно мъжкия пол на хромозомата.

Най-ефективният метод за определяне на пола на говеждия ембрион е да се открие наличието или отсъствието на специфична за Y-хромозома ДНК последователност, която

показва мъжки ембрион (Akiyama et al. 2010). Наличието на тази специфична за Y-хромозома ДНК се изследва чрез използване на специфични за Y-хромозома белязани ДНК сонди. Ако настъпи хибридизация, това показва, че половата хромозома е на мъжки ембрион (Wakchaure et al. 2015).

Предимства на метода са, че е много точен, изискването за материал за приготвяне на ДНК е много по-малко (ок. 20 ng) и ембрионът не се влияе неблагоприятно (Sharma et al. 2017). Биотинилираната Y-специфична проба улеснява определянето на пола на ембриона в говежди ембриони в рамките на 30 часа (Leonard et al. 1987). Независимо дали ДНК сондирането е инвазивен метод и изисква умело микроманипулиране на ембриона, то е един от най-прецизните начини за определяне на пола на ембриона (Sharma et al. 2017). С този метод може да бъде определен по пол по-висок процент от ембрионите, отколкото с кариотипиране, тъй като не е необходимо клетките да са в метафаза.

Недостатъци са сложната и скъпа техника, която отнема време и е ограничена от достъпността на ембрионален материал за биопсия.

4. Метод на полимеразна верижна реакция (PCR)

В началото на 1990 г. Kary Mullis изобретява PCR, чрез който човек може да направи милиони копия на ДНК проба. Понастоящем това е метод на избор за определяне на пола на плода с помощта на ДНК фрагмент от майчина плазма (Da Cruz et al. 2012). Методът за определяне на пола на ембриони при говеда чрез амплифициране на специфични ДНК последователности на Y-хромозома с помощта на PCR се оказва ефективен инструмент за повлияване на съотношението между половете.

Определянето на пола на ембриона с помощта на PCR включва биопсия на ембриона (1-4 бластомера), амплификация на ДНК фрагменти (специфични за един вид и един специфичен за мъж), и интерпретация след анализиране на амплифицираните продукти

с електрофореза. При PCR амплификация се извършва Ко-амплификацията на специфичен за Y-хромозома ген (Sry) и автозомен ген (напр. Aml-X), за да се получат различни размери на фрагменти от Y-хромозомни и автозоменни продукти.

Използването на PCR е най-надеждният и прост метод за определяне на пола на ембрионите при говеда (Schroder et al. 1990). Има почти 100% точност (Kouamo and Kharche, 2014), чувствителен и бърз и може да се извърши за няколко часа. Чрез този метод може да бъде определен полът на голям процент от ембрионите, без да се нарушава способността им за развитие. Bondioli et al. (1989) съобщават за бременности повече от 40% от замразени-размразени ембриони, на които е определен пола чрез PCR преди замразяване.

Предимства - чувствителната, точна, надеждна и ефективна процедура, без да засяга нивата на бременност. Отстраняването на няколко клетки причинява много малка травма на ембрионите. Този метод не променя потенциала за развитие *in vitro*. Ембриобиопсията може да се използва едновременно за мултиплексно генотипиране на говежди ембриони (Reipiro et al., 2007) и за генетично изследване за наследствени заболявания. Амплификацията на специфична за Y хромозома ДНК чрез PCR техниката е най-надеждният и практичен метод за определяне на пола на говежди ембриони (Herr et al. 1991).

Недостатъци са, че се изискват технически умения и отнема много време. Крие риск от фалшиви положителни резултати поради ограниченото количество ДНК в биопсии на ембриони, междувидово ДНК замърсяване, ДНК замърсяване по време на работа с ДНК продуктите при PCR процедури и електрофореза (Bredbacka, 1998).

5. *Loop-медиирани изотермични усилвания*

Определянето на пола на ембриона въз основа на специфични последователности на Y-хромозомата е демонстрирано чрез амплификация чрез PCR от малък брой бласто-

мери (Alves et al. 2006). Hirayama et al. (2004) съобщават за изотермична амплификация, медирана от реакция на верижно заместване (Loop-mediated isothermal amplification - LAMP), което е по-прост метод за определяне на пола на говежди ембрион в сравнение с PCR. В LAMP ДНК амплификацията се извършва в изотермично състояние с помощта на ДНК полимеразата и четири набора от специфични ДНК праймери за ДНК синтез, заедно с набор от праймери за ускоряване на реакцията на LAMP (Notomi et al. 2000). Вътрешният праймер и външните праймери произвеждат ДНК структура на стволва верига и след това голямо количество ДНК се амплифицира чрез реакцията на автоциклиране (Hirayama et al. 2013). Амплификацията на целевата ДНК се оценява чрез измерване на мътноста, дължаща се на бяла утайка от магнезиев пирофосфат, страничен продукт от синтеза на ДНК (Zhang et al. 2009).

Предимства: Базираният на LAMP метод за определяне на пола има добра чувствителност и е точен, бърз и лесен за изпълнение за определяне на пола на ембриони от говеда (Hirayama et al. 2013). Използват се преносими или по-евтини инструменти.

Недостатъци: Електрофорезата е надеждна техника за тълкуване на резултата от LAMP, но отнема много време, нуждае се от система за гел-изобразяване и система от апарати за електрофореза, които са трудни за прилагане за полеви цели (Zhang et al. 2009).

6. *Флуоресцентна in situ хибридизация (FISH)*

Техниката флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) може да открие специфични ДНК последователности на отделни хромозоми от клетка (Kobayashi et al. 2004). Този метод може да се използва не само за определяне на пола на ембриона, но и за откриване на хромозомния мозаицизъм и анеуплоидията в ембрионите. Чрез използване на ДНК сонда, специфична за Y хромозомата при флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH), мъжките и женските ембриони могат да бъдат ди-

ференцирани. Senariu et al. (2011) съобщават, че точността на метода FISH за определяне на пола на говежди ембриони е 86,66%.

Предимства на метода е, че рискът от замърсяване на пробата е незначителен (Sharma et al. 2017).

Недостатъци: Тази инвазивна техника е много сложна, скъпа и отнема време.

Неинвазивните методи за определяне пола на ембриона са предпочитани, тъй като запазват целостта на ембриона, ембрионите остават непокътнати и жизнеспособни и се осигурява оптимално и нормално ембрионално развитие. Неинвазивното определяне на пола е с по-малка точност от инвазивните техники (Sharma et al. 2017). Някои неинвазивни методи са:

1. Откриване на X-свързани ензими
2. Откриване на H-Y антигени.
3. Определяне на пола въз основа на разделяне и развитие

Откриване на X-свързани ензими

При бозайниците има две X-хромозоми за хомогаметен пол и една за хетерогаметен пол. При X-свързаните ензими генната доза се използва за разграничаване на мъжки и женски ембриони. Някои ензими напр. Глюкозо-6-фосфат дехидрогеназата (G6PD), хипоксантин фосфорибозил трансферазата (HPRT), фосфоглицерат киназата са свързани с X-хромозомата (Wakchaure et al. 2015). Тези ензими се измерват в ембрионите. Високата концентрация на ензима обикновено означава две X хромозоми или женски ембрион, а ниската концентрация означава една X хромозома или мъжки ембрион.

Активирането на ембрионалния геном в говеждия ембрион се случва между 8 до 16-клетъчен стадий (Frei et al. 1989), но точно то време на инактивиране на X-хромозомата в ембриона не е известно, то може да се случи по време на стадия на бластоциста. В периода между активирането на ембрионалния геном и инактивирането на една X-хромозома, мъжкият и женският ембрион могат да бъдат разграничени чрез оценка на концентрациите на

X-свързаните ензими. Съотношението на активността на X-свързания ензим към активността на автозомния ензим е по-ниско при мъжките, отколкото при женските ембриони поради вариации в метаболизма на ембриона.

При говежди ембриони показват по-висока активност на глюкоза и глутамин при женските, отколкото при мъжките. Въпреки че измерването на X-свързаната ензимна активност има доста голяма точност, се срещат и много ограничения като трудност при събиране на малки количества ензими, по-продължително излагане на ембриона на външната среда води до намалена жизнеспособност на ембриона и възможности за фалшива диагноза поради междинни стойности (Pratheesh et al. 2011). Жизнеспособността на ембриона е намалена, особено при ембриони с много висока или много ниска ензимна активност. Някои времеви резултати също могат да бъдат двусмислени поради частичното инактивиране на X-хромозомата (Kouamo и Kharche, 2014). Този анализ може също да бъде токсичен за ембрионите, което може да повиши процента на смъртност (Wakchaure et al. 2015).

Предимства на метода са, че позволява да се определи пола на всички ембриони.

Недостатъци: Жизнеспособността на ембриона е намалена, особено за ембриони с много висока или много ниска ензимна активност. Ембрионът трябва да се държи навън за по-дълго време, за да се оцени ензима. Възможно е да съществуват вариации, водещи до фалшива диагноза. Анализът може да е токсичен за ембрионите.

Откриване на мъжки специфичен фактор (H-Y антиген) чрез анти тяло

Мъжкият специфичен антиген на клетъчната повърхност се нарича хистосъвместим-Y или H-Y антиген. Този антиген се намира в соматичните клетки на хетерогаметния пол на всички видове. Откриването на H-Y антиген може да се използва като метод за определяне на пола на ембрионите. H-Y антигенът върху ембриони може да бъде открит чрез анализ за цитотоксичност и чрез имунофлу-

оресцентен анализ. При цитотоксичен анализ се разработва поликлонален антисерум срещу Н-У антиген и в присъствието на комплекс ембрионите се инкубират с този антисерум. Мъжките ембриони се убиват поради имунна реакция, докато незасегнатите ембриони са женски, които са годни за трансфер (Anderson, 1987).

С помощта на имунологични техники (с използване на поликлонални и моноклонални антитела) присъствието на Н-У антиген е доказано върху ембрион от 8-клетъчен стадий до стадий бластоцист, т.е. предварително имплантиран ембрион при всички видове бозайници, напр. говеда (Booman et al. 1989). При или след бластоциста е много трудно да се открие Н-У антиген (Wakchaure et al. 2015). При тази техника ембрионите се инкубират с ниска концентрация на Н-У антитела и след това с флуоресцентно маркирани вторични антитела, които са били отгледани срещу Н-У антитела. Обикновено вторичните антитела се маркират с флуоресцеин изотиоцианат (FITC), но за повишаване на интензитета може да се използва и Rphycoerythrin (RPE) (Booman et al. 1989). Изследването с флуоресцентна микроскопия показва, че мъжките ембриони флуоресцират (Н-У положителни), а женските ембриони не флуоресцират (Н-У отрицателни). Точността на техниката е 90% при мишки, 85% при овце и 81% при свински ембриони, т.е. приблизително 85% точност при идентифициране на пола на ембриона (Anderson, 1987).

Индиректната флуоресцентна техника позволява ембриотрансфер без криоконсервация с очевидно по-малко компрометирана жизнеспособност на ембриона (Kouamo и Kharche, 2014).

Предимства: Имунологичният подход не е точен като цитотоксичния подход, но е сравнително бърз, лесен за изпълнение, не изисква специални манипулационни умения и също така не се нуждае от биопсия на ембриони (Bredbacka, 1998).

Недостатъци: Ограничението на този анализ е, че се произвеждат само женски инди-

види, докато мъжките се унищожават. Антителата срещу Н-У антигена не са напълно специфични за пола, т.е. поради кръстосаните реакции, тези антитела могат да покажат фалшив положителен резултат. Също така поради обработката на ембриона, степента на зачеване може да бъде засегната.

Определяне на пола въз основа на разделяне и развитие

Разделянето, както и скоростта на развитие са по-бързи в клетките на мъжките ембриони, отколкото в женските, за да се достигнат стадии на морула и бластоциста (Sharma et al. 2017). Въпреки че този метод е прилаган до 7-дневен ембрион, пола на ембриона може да се определи още в 2-клетъчния стадий. Yadav et al. (1993) предполагат, че Y-сперматозоидите активират ембрионалния геном за транскрибиране на растежни фактори преди ембрионална транскрипция, което може да повиши скоростта на клетъчно делене в мъжки ембриони, т.е. по-бърза скорост на развитие.

Проблемът при този метод за определяне на пола на ембриона е, че е почти невъзможно да се получи достъп до точното време на разделяне *in vivo* и също така са необходими големи умения, за да се оцени разликата в скоростта на развитие, тъй като тя е много оскъдна (Sharma et al. 2017).

Някои от приложенията на определяне на пола на ембриони са: Промяна на съотношението мъжки и женски пол при селскостопанските животни; увеличаване на производството на мляко и месо; контрол на случаите на фримартинизъм; в управлението на дивата природа като стратегия за опазване на застрашен вид и като схеми за размножаване в зоологически градини; за генетичната регулация на свързаните с пола заболявания при хора.

Ограниченията, които се срещат при прилагане на процедурата са следните: Лоши инфраструктурни съоръжения; ниско ниво на образование и обучение на персонала; висока цена на технологията; разлика между изследователски и полски условия; по-малко наличие на местни технологии и материали.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определянето на пола на ембрионите има голям потенциал за максимизиране на ефективността на производството на млечни продукти чрез контролиране на съотношението между половете на домашните видове. Позволява избор на желан пол въз основа на изискванията на производителите, за да се сведат до минимум загубите поради умъртвяване на нежелани животни. Определянето на пола на ембрионите може да потенцира техниката за ембриотрансфер на множествена овулация (МОЕТ) с цел повишаване на точността на селекцията и намаляване на разходите за МОЕТ чрез увеличаване на женските (Nicholas and Smith, 1983).

Определянето на пола на ембриона може да бъде възможно въз основа на разликата в хормоналния профил на плода от различен пол. В говеждите ембриони има някои специфични за пола механизми, регулиращи сигналните събития на имплантиране, както Larson et al. (2001) предполагат по-високото производство на сигнален фактор като интерферон тау в женски ембриони. По същия начин, мъжките ембриони имат по-бързо развитие, когато са изложени на по-високи серумни концентрации на глюкоза *in vitro* (Gutierrez-Adan et al. 2001). Всички тези методи не са добре проучени и се нуждаят от повече изследвания, за да се подобри тяхната ефикасност и точност.

Въпреки че инвазивните методи, като цитологичното кариотипиране, имат добра точност, те не могат да се прилагат на полево ниво, тъй като оцеляването на ембриона е компрометирано. Откриването на Х-свързани ензими, НУ антиген, хормонален анализ, разлика в скоростта на разделяне и развитие и т.н. нямат голяма практическа стойност. От всички тези методи PCR, FISH и LAMP са ефективни, високонадеждни и точни процедури за определяне на пола на ембриони.

Контролът на съотношението между половете на домашните видове е от голямо търговско значение за селското стопанство и науката за животните и приложенията на тези

методи за определяне на пола се разширяват далеч отвъд животновъдната индустрия. Всички тези методи се нуждаят от повече изследвания, за да се подобри тяхната ефикасност и точност.

ЛИТЕРАТУРА

- Akiyama, K., Kobayashi, J., Sato, Y., Sata, R., Ohashi, M., Sasaki, E., Oda, Y., Ogawa, Y., Ueda, S., Nabenishi, H. & Matoba, S. (2010). Calf production from vitrified bovine sexed embryos following in- straw dilution. *Anim. Sci. J.*, 81, 461 - 466.
- Alves, B. C., Mayer, M. G., Taber, A. P., Egito, A. A., Fagundes, V., McElreavey, K. & Moreira-Filho, C. A. (2006). Molecular characterization of a bovine Y-specific DNA sequence conserved in taurine and zebu breeds. *DNA Sequen.*, 17(3), 199 - 202.
- Anderson, G. B. (1987). Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology*, 27, 87 - 97.
- Barr, M. L. & Bertram, E. G. (1949). A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behaviour of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature*, 163(4148), 676 - 677.
- Bondioli, K. R., Ellis, S. B., Pryor, J. H., Williams, M. W. & Harpold, M. M. (1989). The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, 31, 95 - 104.
- Booman P., Kruijt L., Veerhuis R., Hengst A.M., Tieman M. and Ruch F.E. (1989). Sexing bovine embryos with monoclonal antibodies against the H-Y antigen. *Livest. Prod. Sci.* 23, 1-7.
- Bredbacka, P. (1998). Recent developments in embryo sexing and its field application. *Reprod. Nutr. Dev.*, 38(6), 605 - 613.
- Cenariu, M., Groza, I., Eموke, P., Bogdan, L., Morar, I., Ciupe, S. & Pop, R. (2011). Sexing of bovine embryos using polymerase chain reaction (PCR) and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). *Romanian Biotechnol. Lett.*, 16(2), 6055 - 6061.
- Da Cruz, A. S., Silva, D. C., Costa, E. O., De, M. Jr. P., da Silva, C. C., Silva, D. M. & da Cruz, A. D. (2012). Cattle fetal sex determination by polymerase chain reaction using DNA isolated from maternal plasma. *Anim. Reprod. Sci.*, 131, 49 - 53.
- Edwards, R. G. & Gardner, R. L. (1967). Sexing of live rabbit blastocyst. *Nature*, 214, 576 - 577.
- Garcia J.F. (2001). Practical considerations of embryo manipulation: preimplantation genetic typing. *Theriogenology*, 56, 1393 - 1399.

- Frei, R. E., Schultz, G. A. & Church, R. B.** (1989). Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8 - 16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 88, 33 - 37.
- Gutierrez-Adan, A., Granados, J., Pintado, B. & De La Fuente, J.** (2001). Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.*, 13, 361 - 365.
- Herr, C. M. & Reed, K. C.** (1991). Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology*, 35, 45 - 54.
- Hirayama, H., Kageyama, S., Moriyasu, S., Sawai, K., Onoe, S., Taka - hashi, Y., Katagiri, S., Toen, K., Watanabe, K., Notomi, T., Ya- mashina, H., Matsuzaki, S. & Minamihashi, A.** (2004). Rapid sexing of bovine preimplantation embryos using loop-mediated isothermal amplification. *Theriogenology*, 62, 887 - 896.
- Hirayama H, Kageyama S, Moriyasu S, Sawai K, Minamihashi A.** (2013). Embryo sexing and sex chromosomal chimerism analysis by loop-mediated isothermal amplification in cattle and water buffaloes. *J. Reprod. Dev.* 59:321-326.
- Kobayashi, J., Nagayama, H., Uchida, H., Oikawa, T., Numabe, T., Takada, N., Sasada, H. & Sato, E.** (2004). Selection of sexed bovine embryos using rapid fluorescence *in situ* hybridisation. *Vet. Record.*, 154, 789 - 791.
- Kouamo, J. & Kharche, S. D.** (2014). An overview of sex selection at conception in mammals. *Iranian J. Appl. Anim. Sci.*, 4(3), 463 - 476.
- Larson, M. A., Kimura, K., Kubisch, H. M. & Roberts, R. M.** (2001). Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule lqIFN-tau. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98, 9677 - 9682.
- Leonard, M., Kirszenbaum, C., Cotinot, C., Chesné, P., Heyman, Y., Stinnakre, M. G., Bishop, C., Delouis, C., Vaiman, M. & Fellous, M.** (1987). Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNAprobe. *Theriogenology*, 27, 248 - 258.
- Nicholas, F. W. & Smith, C.** (1983). Increased rates of genetic changes in dairy cattle by transfer and splitting. *Anim. Prod.*, 36, 341 - 353.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T.** (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28, 63.
- Peippo, J., Viitala, S., Virta, J., Rätty, M., Tammiranta, N., Lamminen, T., Aro, J., Myllymäki, H. & Vilkkilä, J.** (2007). Birth of correctly genotyped calves after multiplex marker detection from bovine embryo microblade biopsies. *Mol. Reprod. Dev.*, 74, 1373 - 1378.
- Pratheesh, M. D., Harish, C., Syam, R. & Anoopraj, R.** (2011). Embryo sexing- recent approaches in domestic animals. *J. Indian Vet. Assoc.*, 9(1), 62 - 63.
- Sachan, V., Kumar, B., Kumar Agrawal, J., Kumar, A. & Saxena, A.** (2020). Methods of embryo sexing in cattle breeding: a review. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.*, 10, 1 - 8.
- Schroder, A., Miller, J. R., Thomsen, P.D., Roschlau, K., Avery, B., Poulsen, P. H., Schmidt, M. & Schwerin, M.** (1990). Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. *Anim. Biotechnol.*, 1, 121 - 133.
- Sharma, M., Singh, A., Sharma, N. & Rawat, S.** (2017). Embryo sexing in cattle: review. *Int. J. Curr. Innov. Res.*, 3, 955 - 960.
- Wakchaure, R., Ganguly, S., Praveen, P. K. & Mahajan, T.** (2015). Methods for embryos sexing and their applications in animal breeding: a review. *Octa J. Biosci.*, 3, 47 - 49.
- Yadav, B. R., King, W. A. & Betteridge, K. J.** (1993). Relationships between the completion of first cleavage and the chromosomal complement, sex, and developmental rates of bovine embryos generated *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 36, 434 - 439.
- Zhang, Z. P., Zhang, Y., Liu, J. P., Zhang, J. T., An, Z. X., Quan, F. S., Zhang, L., Cai, X. & Pu, S. W.** (2009). Code position of dNTPs detection for rapid LAMP-based sexing of bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.*, 44(1), 116 - 121.

Received: April, 15, 2025; Approved: May, 08, 2025; Published: June, 2025