



Biotechnologia rozrodu zwierząt gospodarskich

Zdzisław Smorąg

Instytut Zootechniki, Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt,
Balice k. Krakowa

Reproductive biotechnology of farm animals

Summary

This paper presents the most important research and application of biotechnology of farm animals reproduction: semen sexing, embryo *in vitro* production, embryonic and somatic cloning and transgenesis.

Key words:

farm animals, biotechnology, reproduction, sperm sexing, embryo IVP, cloning, transgenesis.

Biotechnologiczne metody rozrodu zwierząt stanowią istotny element hodowli i produkcji zwierzęcej. Ich zaawansowanie wynika z rozwoju nauk biologicznych, a w szczególności takich specjalności jak: fizjologia, endokrynologia, embriologia, biologia molekularna czy eniobiologia. Możliwości, jakie stwarzają dla hodowli biotechnologiczne metody rozrodu odnoszą się do kilku ważnych problemów z punktu widzenia produkcyjnego oraz dobrostanu zwierząt, takich jak lepsze wykorzystanie potencjału rozrodczego samców i samic, regulacja płci, wprowadzanie genetycznych zmian oraz zachowanie zdrowotności zwierząt.

Skala zainteresowań badawczych oraz praktycznego wykorzystania omawianych metod u poszczególnych gatunków zwierząt jest uzależniona zarówno od ich gospodarczego zna-

Adres do korespondencji

Zdzisław Smorąg,
Instytut Zootechniki,
32-083 Balice k. Krakowa.

czenia, jak też specyfiki gatunkowej rozrodu, a zwłaszcza od wydajności rozrodczej gatunku.

W opracowaniu przedstawiono najbardziej istotne badania i praktyczne zastosowania metod biotechnologii rozrodu zwierząt gospodarskich w kilkunastu ostatnich latach. Zaprezentowano możliwości i ograniczenia metod oraz perspektywy ich rozwoju. Omówiono także stan badań na świecie oraz ich zaawansowanie w kraju odnoszące się do biotechnologii rozrodu ssaków gospodarskich.

1. Regulacja płci na poziomie gamet i zarodków

Płeć rodzącego się potomstwa ma istotne znaczenie, zarówno z punktu widzenia hodowli i selekcji zwierząt, jak też chowu zwierząt dla celów towarowych. Rozwijane i stosowane są zatem metody seksowania zarodków oraz nasienia. Biorąc pod uwagę dysproporcję możliwości rozrodczych samic i samców jest oczywiste, że w praktyce bardziej atrakcyjna jest regulacja płci poprzez użycie do zapłodnienia plemników pożądanej płci.

1.1. Seksowanie nasienia

Zainteresowanie tym problemem datuje się od kilkudziesięciu lat, czyli od momentu wprowadzenia sztucznego unasieniania do praktyki. Próby opracowania metody seksowania nasienia do momentu pojawienia się cytometrii przepływowej były nieskuteczne. Przełom nastąpił wraz z wprowadzeniem tej metody. Wiele badań z tego zakresu przeprowadzonych w ostatnim dziesięcioleciu stworzyło możliwości seksowania nasienia samców zwierząt gospodarskich z ok. 90% dokładnością. Do niedawna dużym ograniczeniem metody była stosunkowo niewielka szybkość analizy i sortowania plemników wynosząca praktycznie około kilkuset komórek na sekundę. Dla potrzeb standardowej inseminacji była to szybkość niewystarczająca.

W ostatnich latach nastąpił istotny postęp w rozwoju cytometrycznego seksowania nasienia umożliwiający już, pod pewnymi warunkami, praktyczne zastosowanie metody dla potrzeb hodowli. Postęp osiągnięto dzięki zastosowaniu cytometru o wielokrotnie większej w stosunku do przyrządów standardowych szybkości analizy oraz modyfikacji dyszy (1). Tak wyspecjalizowany cytometr przepływowy jest zdolny do osiągnięcia przepływu ok. 70 milionów plemników na godzinę o czystości sortowania wynoszącej powyżej 90%. Przy założeniu mniejszej, bo wynoszącej ok. 75% czystości sortowania, szybkość sortowania można znacząco zwiększyć. Zakładając, że liczba plemników w standardowej dawce inseminacyjnej dla bydła wynosi 16 mln plemników, można w ciągu godziny uzyskać przeszło 4 dawki. Istnieje jednak możliwość znacznego zredukowania liczby plemników w dawce inseminacyjnej, jeśli zastosowana zostanie inseminacja domaciczna. Dotyczy to również takich gatunków

jak świnię czy owce. Na uwagę zasługują tu doświadczenia przeprowadzone przez Seidla i wsp. (2). Autorzy we współpracy z firmą XY (Ft. Collins Co) inseminowali domacicznie tysiąc jałówek, uzyskując wyniki płodności jedynie o 10% niższe od obserwowanych w grupie kontrolnej. Proporcja płci urodzonego potomstwa potwierdzająca dokładność sortowania wynosiła ok. 90%.

Z praktycznego punktu widzenia bardzo istotna, zwłaszcza w przypadku bydła, jest możliwość zamrażania sortowanego nasienia. Możliwość taką potwierdziły badania prowadzone przez Schenka i wsp. (3), Johnsona (4), a także Seidla i wsp. (2), którzy uzyskali wycielenia po inseminacji nasieniem sortowanym (przy dokładności sortowania wynoszącej ok. 90%) i mrożonym oraz dawce inseminacyjnej zawierającej 1,5 mln plemników.

Na podstawie przedstawionych możliwości specjalizowanych na seksowanie nasienia cytometrów przepływowymi w kilku krajach świata rozpoczęto stosowanie metody do celów praktycznych. Uzyskiwane wyniki seksowania nasienia są na tyle zachęcające, że uzasadniają próby praktycznego zastosowania tej metody w Polsce. Szczególnie ważne zwłaszcza w hodowli bydła, gdzie z powodów BSE doszło do ograniczenia popytu na mięso wołowe, są oczekiwania hodowców na zwierzęta płci żeńskiej.

W Instytucie Zootechniki prowadzone są od szeregu lat badania nad zastosowaniem cytomerii przepływowej w biotechnologii rozrodu zwierząt m.in. dla potrzeb oceny zdolności zapładniającej nasienia (5) oraz jego seksowaniem (6,7). Obecnie prowadzi się te prace z użyciem cytometru specjalizowanego na seksowanie nasienia. Zakładamy, że w 2002 r. przeprowadzimy pierwsze inseminacje seksowanym nasieniem buhaja.

1.2. Seksowanie zarodków

Jest to pewna alternatywa dla sortowania nasienia na frakcję męską i żeńską. W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku podstawową metodą określania płci zarodków przeżuwaczy stała się identyfikacja sekwencji DNA specyficznych dla chromosomu Y przy użyciu PCR. Metoda pozwala na seksowanie zarodków przed ich przeniesieniem do zsynchronizowanych bioczyń. Osiągana dokładność seksowania wynosi ok. 95%, a uzyskiwane wyniki przenoszenia takich zarodków wynoszą od 50 do 70% (8). Metoda nie jest stosowana rutynowo. Wynika to z przesłanek ekonomicznych, gdyż uzyskiwanie potomstwa o pożądanej jednej płci na tej drodze związane jest z niewykorzystaniem połowy będących do dyspozycji zarodków, których produkcja mimo stosowania superowulacji czy metod pozaustrojowej produkcji jest wciąż ograniczona.

W kraju seksowanie zarodków bydlęcych na skalę laboratoryjną było stosowane przez Waydę i wsp. (9). Z powodzeniem zostały przeprowadzone również przez Płucienniczaka i wsp. badania, których celem było znalezienie nie opatentowanych sekwencji DNA, charakterystycznych dla chromosomu Y (10).

2. Pozaustrojowa produkcja zarodków

Rozwój metod pozaustrojowej produkcji zarodków przypada na lata dziewięćdziesiąte ubiegłego wieku. Najwięcej badań z tego zakresu wykonano na bydło. W przypadku tego gatunku pozaustrojowa produkcja zarodków stosowana jest już na skalę praktyczną. Ocenia się, że w Europie około 10% zarodków wykorzystywanych w programach przenoszenia zarodków jest uzyskiwanych w warunkach *in vitro*.

Pozaustrojowa produkcja zarodków jest metodą kompleksową i obejmuje trzy główne ogniwa: dojrzewanie oocytów, zapłodnienie *in vitro* oraz kilkudniową hodowlę *in vitro* uzyskanych zygot. U bydła odsetek dojrzałych oocytów jest wysoki, sięga bowiem 80-90%, a około 70% z nich podejmuje podziały, jednak do stadium blastocysty, w którym zarodki są przenoszone biorczyniom, rozwija się tylko około 30%. Istnieje zatem potrzeba poprawy efektywności technologii pozaustrojowego uzyskiwania zarodków (11,12).

Ważną metodą towarzyszącą pozaustrojowej produkcji zarodków jest przyżyciowe uzyskiwanie oocytów od krów-biorczyń pod kontrolą USG (13,14). Metoda umożliwia wielokrotne uzyskiwanie niedojrzałych oocytów z antralnych pęcherzyków jajnikowych od niestymulowanych samic.

Problemem wymagającym wciąż lepszego rozwiązania jest poszukiwanie optymalnych metod hodowli *in vitro* umożliwiających zarówno zwiększenie odsetka rozwijających się do stadium blastocysty zarodków, jak też poprawę jakości tych zarodków. Uzyskiwane *in vitro* zarodki posiadają bowiem w stosunku do zarodków uzyskiwanych *in vivo* obniżoną zdolność implantacyjną oraz niższą podatność na kriokonserwację.

Innym niekorzystnym zjawiskiem związanym z wykorzystywaniem wyprodukowanych *in vitro* zarodków jest syndrom dużego cielęcia oraz różnych anomalii rozwojowych potomstwa (cyt. za 15). Wyjaśnienie przyczyn tych zjawisk jest przedmiotem badań.

Technologia pozaustrojowego uzyskiwania zarodków u innych gatunków zwierząt gospodarskich nie jest tak rozwinięta jak u bydła. Obserwuje się znaczne różnice gatunkowe i tak stosunkowo dobre efekty osiąga się w produkcji zarodków owczych (16) i kozich (17). U koni udało się uzyskać tą metodą jedynie kilka źrebait (18). Duże problemy stwarza zapłodnienie *in vitro* oocytów świńskich (19).

Metodą ułatwiającą wykorzystanie zarodków w programach hodowlanych jest ich kriokonserwacja. Opracowane zostały efektywne metody kriokonserwacji zarodków bydłocych, owczych, czy kozich (20). Wciąż nie rozwiązany problem jest kriokonserwacja zarodków świńskich (21). Przyczyną tego jest duża zawartość lipidów w komórkach zarodków tego gatunku.

Nieco odmiennym zagadnieniem jest kriokonserwacja oocytów. Mimo znacznego postępu, jaki osiągnięto w tym zakresie w ostatnich latach (22) problem nie jest jeszcze rozwiązany.

Badania nad pozaustrojową produkcją zarodków zwierząt gospodarskich są z powodzeniem rozwijane w naszym kraju. Dotyczą one w głównej mierze bydła

(23-25,30), ale były też prowadzone na owcach (26), kozach (27) i koniach (28). W badaniach dotyczących produkcji *in vitro* zarodków bydłęcych prowadzonych przez Kątską i wsp. (29) uzyskiwana efektywność metody jest porównywalna z wynikami uzyskiwanymi na świecie. Prace te koncentrują się na określeniu warunków kapacytacji nasienia (25), badaniu roli osłonki przejrzystej w procesie zapłodnienia (31) oraz poszukiwaniu optymalnych metod kilkudniowej hodowli *in vitro* (29,30).

Podejmowane były też próby u bydła uzyskiwania zapłodnienia pozaustrojowego metodą niechirurgicznego wprowadzania pojedynczych plemników do cytoplazmy oocyty – ICSI (32). W przeciwieństwie do oocytów ludzkich, gdzie metoda ta jest rutynowo stosowana, w przypadku bydła jej efektywność jest bardzo niska – odsetek uzyskiwanych na tej drodze zarodków nie przekracza kilku procent (33). Rozwijana jest też metoda przyżyciowego uzyskiwania oocytów bydłęcych do zapłodnienia *in vitro* (34,35). Innym kierunkiem badań związanym z pozaustrojową produkcją zarodków są badania prawidłowości kariotypów oocytów (36).

Technologia pozaustrojowej produkcji zarodków w Polsce nie wyszła poza skalę laboratoryjną. Jest to związane z ograniczonym zakresem stosowania przenoszenia zarodków bydłęcych z przyczyn ekonomicznych polskiej hodowli.

3. Klonowanie zarodkowe i somatyczne

3.1. Klonowanie zarodkowe

Najprostszą metodą klonowania zarodkowego jest bisekcja zarodków. Zabieg ten przeprowadzany jest w większości na zarodkach znajdujących się w stadium blastocysty (37,38). Bisekcja umożliwia otrzymanie monogenetycznych par bliźniąt; efektywność transplantacji uzyskanych w wyniku bisekcji „połówek” w granicach 50% można osiągnąć w przypadku użycia do zabiegu zarodków najwyższej jakości. Obniżona zdolność transplantacyjna poddanych bisekcji zarodków wynika ze zredukowanej o połowę w stosunku do całego zarodka liczby komórek uszczuplonej dodatkowo w wyniku inwazyjności metody (39). Kriokonserwacja „połówek” zarodków uzyskanych w wyniku bisekcji jest mało efektywna z powodu dalszych strat komórkowych jakie powstają w wyniku ich zamrażania i rozmrażania. Mimo tych ograniczeń metoda bisekcji zarodków znalazła praktyczne zastosowanie w programach przenoszenia zarodków bydłęcych (40).

W kraju wykorzystanie metody nie wykracza poza próby na poziomie laboratorium. Pierwsze monozygotyczne jagnięta (41) oraz cielęta (42) uzyskano przed piętnastu laty. Interesującym, oryginalnym wkładem krajowym w tej dziedzinie było opracowanie zmodyfikowanej metody bisekcji zarodków opartej na prowokowanym i zarazem kontrolowanym wylęganiu blastocyst (43). W rezultacie takiego za-

biegu redukuje się do minimum straty komórkowe, jakie mają miejsce w trakcie stosowania konwencjonalnej metody bisekcji.

Następną odmianą klonowania zarodkowego jest metoda transplantacji jąder komórkowych. W odróżnieniu do metody bisekcji umożliwia ona otrzymanie klonów składających się z więcej niż dwu osobników. Zainteresowanie tą metodą klonowania zmalało, gdy uzyskano klony w wyniku klonowania somatycznego (44,45), a następnym tego powodem była bardzo niska efektywność tej metody (46). Najbardziej liczny klon, jaki uzyskano stosując tę metodę składał się z siedmiu cieląt (47).

Badania krajowe z zakresu klonowania metodą transplantacji jąder komórkowych były prowadzone na króliku (48,49). W badaniach tych możliwości rozwojowe rekonstruowanych zarodków oceniano *in vitro* i uzyskiwano ich rozwój do stadium blastocysty. W innych badaniach zastosowano metodę tzw. seryjnego klonowania, która zaowocowała urodzeniem się żywych króliczych klonów (50).

Odmianą klonowania zarodkowego jest klonowanie, w którym jako materiał genetyczny wykorzystywane są pierwotne komórki zarodkowe. Pierwotne komórki zarodkowe (PKZ) uzyskuje się hodując zarodek lub jego część *in vitro* w warunkach, w których następuje proliferacja niektórych jego komórek w kontakcie z podłożem hodowlanym (51). Hodowla takich komórek może być pasażowana wielokrotnie stając się źródłem wprost nieograniczonej liczby komórek – dawców. Ograniczeniem tej metody stwierdzonym w przypadku PKZ myszy był fakt, że przeżywają po urodzeniu tylko osobniki pochodzące z zarodków, do których wykorzystywano PKZ niskich pasaży (52). Fakt ten wskazuje, jak się wydaje, że mysie PKZ w trakcie hodowli *in vitro* tracą swoją totipotencję.

Mimo publikacji, w których autorzy sugerują otrzymanie PKZ zwierząt gospodarskich (53) nie ma w pełni przekonujących dowodów, że mają one właściwości PKZ. W kraju badania nad PKZ myszy (54), a także owcy prowadzone są przez Modlińskiego i jego zespół (55).

3.2. Klonowanie somatyczne

Badania z zakresu klonowania somatycznego ssaków, mające już sześćdziesięcioletnią historię, cieszą się nie słabnącym zainteresowaniem. Wynika to nie tylko z możliwości uzyskania klonów o dużej liczebności, lecz także z możliwości uzyskiwania na tej drodze zwierząt transgenicznych. Praktyczna wartość klonowania somatycznego będzie jednak uwarunkowana efektywnością metody, która na razie jest bardzo niska, bowiem liczba urodzonych zwierząt w stosunku do liczby zrekonstruowanych zarodków waha się od 1 do 2%. Pierwszym sklonowanym zwierzęciem była, jak wiadomo, owca (56). Następne badania, jakie prowadzono nad klonowaniem zwierząt gospodarskich, dotyczyły takich gatunków jak: bydło (57), kozy (58) i świnie (59). U wszystkich wymienionych gatunków uzyskano już sklonowane zwierzęta.

Szczególnym zainteresowaniem w ostatnich latach cieszą się badania nad klonowaniem świni, wiąże się to bowiem z możliwością wykorzystania organów transgenicznych świń w transplantologii u ludzi.

Badania z zakresu klonowania somatycznego zwierząt gospodarskich koncentrują się na wyjaśnieniu uwarunkowań i przyczyn niskiej efektywności metody. Z prac poświęconych przemodelowaniu i przeprogramowaniu jąder komórek somatycznych wynika, że moment rozpoczęcia aktywności transkrypcyjnej przez zarodek nie może być czynnikiem limitującym rozwój rekonstruowanych zarodków, a przyczyny niskiej efektywności klonowania leżą gdzie indziej.

Sporo uwagi poświęcono testowaniu przydatności różnych rodzajów komórek somatycznych zwierzęcia do klonowania. Były to komórki o zdefiniowanym fenotypie, jak np. komórki pęcherzykowe (60), komórki nabłonkowe jajowodu i macicy (61), komórki nabłonkowe gruczołu mlekowego (62), oraz leukocyty krwi obwodowej (63). Wykorzystywano też komórki, których fenotyp i pochodzenie nie zawsze były dokładnie określone. Były to głównie komórki o morfologii fibroblastów wyprowadzone z tkanek dorosłych zwierząt, takich jak tkanka uszna czy skóra (64), mięsień najdłuższy grzbietu (65,66) oraz z fragmentów tkanek płodowych (67,68).

Wiele uwagi poświęcono synchronizacji cyklu komórkowego w fazie G0/G1 populacji komórek somatycznych, dawców jąder opracowując kilka sposobów synchronizacji, przy czym najczęściej stosowaną metodą jest „głodzenie” (69). Nie jest to metoda odpowiednia dla synchronizacji cyklu komórek świńskich, dla których opracowano alternatywną metodę polegającą na ich hodowli *in vitro* do stanu pełnej konfluencji (70). Dla uzyskania komórek G0/G1 wykorzystywana jest też cytometria przepływowa w celu odsortowania populacji komórek tej frakcji (71).

Innym ważnym czynnikiem rozwoju rekonstruowanych zarodków jest sztuczna aktywacja. Uzyskiwano ją stosując różne warianty elektroaktywacji (72) lub używając do tego celu czynników chemicznych (73). Stosowane do tej pory metody aktywacji mają wiele niedostatków, trwają badania mające na celu ich wyeliminowanie.

Dużym problemem klonowania somatycznego są poważne straty postimplantacyjne oraz okołoporodowe. Większość poronień powodowana jest nieprawidłowym łożyskiem. Często są też poważne defekty stwierdzone u narodzonego potomstwa takie jak pneumonia czy zaburzenia krążeniowe (74).

W krajowych badaniach z zakresu klonowania somatycznego przeprowadzonych na bydle (66), kozach (75) i owcach (76) uzyskano znaczny odsetek rozwijających się *in vitro* zrekonstruowanych zarodków, jednak pełnego rozwoju *in vivo* do tej pory nie stwierdzono. Doświadczenia skoncentrowane są m.in. na badaniach dotyczących cytometrycznej analizy i synchronizacji cyklu komórkowego oraz odsortowywaniu z badanych populacji fazy G0/G1 (77).

4. Transgeneza zwierząt

Uzyskiwanie zwierząt transgenicznych ze względu na olbrzymi potencjał cieszy się rosnącym zainteresowaniem nie tylko na świecie, ale również i w Polsce. Podstawową metodą uzyskiwania zwierząt transgenicznych, zarówno laboratoryjnych jak i gospodarskich, jest mikroiniekcja egzogenego DNA do przedjądra zapłodnionej komórki jajowej. W ostatnich latach w związku z rozwojem metod klonowania somatycznego powstała możliwość uzyskiwania transgenicznych zwierząt poprzez użycie do klonowania jąder komórek z wprowadzonymi konstruktami genowymi. Podejmowane są też próby uzyskiwania zwierząt gospodarskich przy zastosowaniu metod ukierunkowanej transgenezy, czyli osobników z wyłączonym lub zmodyfikowanym genomem.

W chwili obecnej zarysowały się następujące kierunki wykorzystania transgenicznych zwierząt gospodarskich, których celem jest:

1) poprawa cech użytkowych zwierząt gospodarskich poprzez oddziaływanie na receptory hormonu wzrostu oraz modyfikacje dotyczące obniżenia zawartości tłuszczu w mięsie i zmiana jego składu (78-80);

2) szeroko rozumiana modyfikacja składu mleka polegająca na poprawie jego przyswajalności dzięki obniżeniu zawartości laktozy; wprowadzenie czynników o działaniu bakteriostatycznym; wzbogacenie składu mleka o białka mające właściwości terapeutyczne (81-83);

3) modyfikacja systemu immunologicznego świni umożliwiająca wykorzystanie transgenicznych osobników jako dawców tkanek i narządów do ksenotransplantacji (84);

4) pozyskiwanie modeli zwierzęcych przydatnych do opracowania odpowiedniej terapii w leczeniu chorób cywilizacyjnych, a także prób z terapią genową, testowaniem farmaceutyków oraz badaniem funkcji genów (*knock-out* genów) (85,86);

5) uzyskiwanie zwierząt odpornych na choroby m.in. na BSE (87).

Podstawowym problemem transgenezy zwierząt gospodarskich pozostaje niska efektywność metody oraz ograniczona oferta konstruktów genowych, interesujących z punktu widzenia realizacji głównych celów transgenezy. Postęp w tym zakresie będzie uwarunkowany lepszym poznaniem genomu zwierząt gospodarskich oraz wynikającym z tego typowaniem właściwych genów kandydatów do modyfikacji. Drugim istotnym warunkiem rozwoju transgenezy zwierząt gospodarskich będzie opracowanie efektywnych metod klonowania somatycznego, wykorzystujących zmodyfikowane linie komórek.

Badania krajowe dotyczące transgenezy ssaków gospodarskich prowadzone są od blisko dziesięciu lat na takich gatunkach jak: królik (88-90), koza (91), świnia (92) oraz bydło (93,94).

Badania z zakresu transgenezy prowadzone na królikach jako zwierzętach hodowlanych dotyczyły modyfikacji genetycznych mających na celu uzyskanie nowego

białka w mleku (88-90), regulację wzrostu (88) oraz wyprodukowanie zwierząt odpornych na choroby (95). Doświadczenia z zakresu transgenetyki kóz koncentrowały się na uzyskaniu zwierząt produkujących mleko o właściwościach bakteriostatycznych. Stosunkowo dużo badań poświęcono transgenicznym świniom. Dotyczyły one użycia genów hormonu wzrostu (96), genów modyfikujących skład mleka dla uzyskania właściwości bakteriostatycznych (92) oraz genów modyfikujących skład tkanki tłuszczowej.

Efektom prowadzonych badań u wszystkich wymienionych gatunków zwierząt było uzyskanie DNA pozytywnych zwierząt, z których część wykazywała ekspresję transgenu.

Literatura

1. Johnson L. A., (2000), *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61, 93-107.
2. Seidel G. E. Jr., Schenk J. L., Herickoff L. A., Doyle S. P., Brink Z., Green R. D., Cran D. G., (1999), *Theriogenology*, 52, 1407-1420.
3. Schenk J. L., Such T. K., Seidel G. E. J., (1999), *Theriogenology*, 52, 1375-1391.
4. Johnson L. A., Welch G. R., Rens W., (1999), *J. Anim. Sci. (Suppl. 2)*, 213-220.
5. Bochenek M., Smorąg Z., Pilch J., (2001), *Theriogenology*, 56, 557-567.
6. Bochenek M., (2000), *Ann. Anim. Sci.*, 26, 4, 219-226.
7. Smorąg Z., Ryńska B., Kątska L., Słota E., (1993), *Anim. Sci Papers and Reports*, 11, 117-120.
8. Bredbacka P., (1998), *Reprod. Nutr. Dev.*, 38, (6), 605-613.
9. Wayda E., Plucienniczak G., Jura J., Plucienniczak A., Kątska L., Skrzyszowska M., Smorąg Z., (1995), *Med. Wet.*, 9, 530-532.
10. Plucienniczak G., Plucienniczak A., (1999), *Acta Biochimica Polonica*, 46, 4, 873-878.
11. Hasler J. F., (1998), *J. Anim. Sci.*, 76, Suppl. 3, 52-74.
12. Bousquet D., Twagiramungu H., Morin N., Brisson C., Carboneau G., Durocher J., (1999), *Theriogenology*, 51, 59-70.
13. Carlin S. K., Garst A. S., Tarraf C. G., Bailey T. L., McGilliard M. L., Gibbons J. R., Ahamadzadeh A., Gwazdauskas F. C., (1999), *Theriogenology*, 51, 1489-1503.
14. Dieleman S. J., Hendriksen P. J. M., Viuff D., Thomsen P. D., Hyttel P., Knijn H. M., Wrenzycki C., Kruijff T. A. M., Niemann H., Gadella B. M., Bevers M. M., Vos P. L. A. M., (2002), *Theriogenology*, 57, 5-20.
15. Wilmut I., Young L., DeSousa P., King T., (2000), *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61, 5-14.
16. Crozet N., Huneau D., DeSmedt V., Theron M. C., Szollosi D., Torres S., Sevellec C., (1987), *Gamete Research*, 16, 159-170.
17. Rho G. J., Hahnel A. C., Betteridge K. J., (2001), *Theriogenology*, 56, 503-516.
18. Palmer E., Bezar J., Magistrini M., Duchamp G., (1991), *J. Reprod. Fert.*, (Suppl.), 44, 375-384.
19. Prather R. S., Day B. N., (1998), *Theriogenology*, 49, 23-32.
20. Gajda B., Smorąg Z., (1998), *Biotechnologia*, 2, 41, 10-32.
21. Dobrinsky J. R., (1997), *J. Reprod. Fert.*, 52, 301-312.
22. Vajta G., (2000), *Anim. Reprod. Sci.*, 2, 60, 357-364.
23. Kątska L., Kauffold P., Smorąg Z., Duschinski U., Torner H., Kanitz W., (1989), *Theriogenology*, 32, 767-777.
24. Kątska L., Smorąg Z., Bak M., Wierzbowski S., (1991), *Medycyna Wet.*, 47 (4), 169-171.
25. Kątska L., Ryńska B., Smorąg Z., (1996), *Anim. Reprod. Sci.*, 44 (1), 23-31.
26. Członkowska M., Ejsmont U., Głuszkiewicz A., Kossakowski M., Dziak J., (1991), *Molec. Reprod. Dev.*, 30, 34-38.
27. Kątska L., Kania G., Ryńska B., Gajda B., Smorąg Z., (2002), *Med. Wet.*, 58 (6), 462-463.
28. Okólski A., Słonina D., Banasinska K., (1993), *Equine Vet. J.*, (Suppl.), 15, 84-86.

29. Kątska L., Ryńska B., Smorąg Z., (1998), *J. Anim. Feed Sci.*, 7, 353-362.
30. Duszewska A. M., Reklewski Z., Pieńkowski M., Karasiewicz J., Modliński J. A., (2000), *Theriogenology*, 54, 1239-1247.
31. Kątska L., Kania G., Smorąg Z., Wayda E., Plucienniczak G., (1999), *Reprod. Dom. Anim.*, 34 (3-4), 255-260.
32. Goto K., Kinoshita A., Takuma Y., Ogawa K., (1990), *Vet. Rec.*, 127, 517-520.
33. Skrzyszowska M., Smorąg Z., Kątska L., Bochenek M., Gogol P., Kania G., Ryńska B., (2002), *Czech J. Anim. Sci.*, 47 (3), 85-91.
34. Smorąg Z., Kątska L., Gogol P., Ryńska B., (1998), *Anim. Sci. Pap. and Rep.*, 16, Suppl. 1, 57-58.
35. Smorąg Z., Gogol P., Kątska L., Jażdżewski J., (1999), *Med. Wet.*, 55 (5), 317-320.
36. Lechniak D., Świtoński M., Sosonowski M., (1996), *Theriogenology*, 46, 267-277.
37. Ozil J. P., (1983), *J. Reprod. Fertil.*, 69, 463-468.
38. Williams T. J., Elsdon R. P., Seidel R. A., (1984), *Theriogenology*, 22, 521-531.
39. Skrzyszowska M., Smorąg Z., (1988), *Theriogenology*, 32, 115-122.
40. Baker R. D., (1985), *Theriogenology*, 23, 225 abstr.
41. Smorąg Z., Ozil J. P., Modliński J. A., Wierzchoś E., Babusik P., Skrzyszowska M., (1985), *Med. Wet.*, 10, 627-629.
42. Skrzyszowska M., Znaniecki R., Bychawski S., Smorąg Z., (1988), *Med. Wet.*, 7, 412-414.
43. Skrzyszowska M., Smorąg Z., Kątska L., (1997), *Theriogenology*, 48(4), 551-557.
44. Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S., (1997), *Nature*, 385, 810-813.
45. Wells D. N., Misica P. M., Tervit H. R., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 996-1005.
46. Stice S. L., Keefer C. L., Matthews L., (1994), *Mol. Reprod. Dev.*, 38, 61-68.
47. Bondioli K. R., Westhusin M. E., Looney C. R., (1990), *Theriogenology*, 33, 165-174.
48. Modliński J. A., Smorąg Z., (1991), *Mol. Reprod. Dev.*, 28, 361-372.
49. Skrzyszowska M., Smorąg Z., (1999), *Ann. Anim. Sci.*, 26(4), 181-198.
50. Piotrowska K., Modliński J. A., Korwin-Kossakowski M., Karasiewicz J., (2000), *Biol. Reprod.*, 63, 677-682.
51. Evans M. J., Kaufman M. H., (1981), *Nature*, 292, 154-156.
52. Nagy A., Rossant J., Nagy R., Abramow-Newerly W., Roder J. C., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8424-8428.
53. Karasiewicz J., (1995), *Biotechnologia* 3(30), 84-89.
54. Modliński J. A., Reed M. A., Wagner T. E., Karasiewicz J., (1996), *Anim. Reprod. Sci.*, 42, 437-446.
55. Karasiewicz J., Szablisty E., Guskiewicz A., Kossakowski M., Stefański G., Reed M., Modliński J. A., (1996), *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 205, 437-442.
56. Schnieke A., Kind A. J., Ritchie W. A., Mycock K., Scot A. R., Ritchie M., Wilmut I., Colman A., Campbell K. H. S., (1997), *Science*, 278, 2130-2133.
57. Cibelli J. B., Stice S. L., Goluece P. J., Kane J. J., Jerry J., Blackwell C., et. al., (1998), *Science*, 280, 1256-1258.
58. Baguisi A., Behboodi E., Melican D. T., Pollock J. S., Destrempes M. M., Cammuso C. H., Williams J. L., Nims S. D., Porter C. A., Midura P., Palacios M. J., Ayres S. L., Denniston R. S., Hayes M. L., Ziomek C. A., Meade H. M., Godke R. A., Gavin W. G., Overstrom E. W., Echelar Y., (1999), *Nature Biotech.*, 17, 456-461.
59. Onishi A., Iwamoto M., Akita T., Mikawa S., Takeda K., Awata T., Hanada H., Perry A. C. F., (2000), *Science*, 289, 1188-1190.
60. Polejaeva J. A., Chen S-H., Vaught T. D., Page R. L., Mullins J., Ball S., Dai Y., Boone J., Walker S., Ayres D. L., Colman A., Campbell K. H. S., (2000), *Nature*, 407, 86-90.
61. Kato Y., Tani T., Sotomaru Y., Kurokawa K., Kato J-Y., Doguchi H., Yasue H., Tsunoda Y., (1998), *Science*, 282, 2095-2098.
62. Kishi M., Itagaci Y., Takakura R., Imamura M., Sudo T., Yoshinari M., Tanimoto M., Yasue H., Kashima N., (2000), *Theriogenology*, 54, 675-684.
63. Galli C., Duchi R., Moor R. M., Lazzari G., (1999), *Cloning*, 1(3), 161-170.
64. Cho J. K., Lee B. C., Park J. I., Lim J. M., Shin S. J., Kim K. Y., Lee B. D., Hwang W. S., (2002), *Theriogenology*, 57, 1819-1829.

65. Shiga K., Fujita T., Hirose K., Sasae Y., Nagai T., (1999), *Theriogenology*, 52, 527-535.
66. Skrzyszowska M., Shoya Y., Nagai T., Geshi M., Takenouchi N., (2000), *Theriogenology*, 53, 244.
67. Verma P. J., Du Z-T., Crocker L., Faast R., Grupen Ch. G., McIlpatrick S. M., Ashman R. J., Lyons I. G., Nottle M. B., (2000), *Mol. Reprod. Dev.*, 57, 262-269.
68. Tao T., Machaty Z., Boquest A. C., Day B. N., Prather R. S., (1999), *Anim. Reprod. Sci.*, 56, 133-141.
69. Zakhartchenko V., Durcova-Hills G., Stojkovic M., Scherthaner W., Prella K., Steinborn R., Muller M., Brem G., Wolf E., (1999), *J. Reprod. Fertil.*, 115, 325-331.
70. Betthausen J., Forsberg E., Augenstein M., Childs L., Eilertsen K., Enos J., Forsythe T., Golueke P., Jurgella G., Koppang R., Lesmeister, T., Mallon K., Mell G., Misica P., Pace M., Pfister-Genskow M., Strelchenko N., Voelker G., Watt S., Thompson S., Bishop M., (2000), *Nature Biotech.*, 18, 1055-1059.
71. Boquest A. C., Day B. N., Prather R. S., (1999), *Biol. Reprod.*, 60, 1013-1019.
72. Zhu J., Telfer E. E., Fletcher J., Springbett A., Dobrinsky J. R., DeSousa P. A., Wilmot I., (2002), *Biol. Reprod.*, 66, 635-641.
73. Loi P., Ledda S., Fulka J. Jr., Cappai P., Moor R. M., (1998), *Biol. Reprod.*, 58, 1177-1187.
74. Hill J. R., Burghardt R. C., Jones K., Long C. R., Looney C. R., Shin T., Spencer T. E., Thompson J. A., Winger Q. A., Westhusin M. E., (2000), *Biol. Reprod.*, 63, 1787-1794.
75. Skrzyszowska M., Smorąg Z., Kątska L., Ryńska B., Kania G., Gajda B., Kareta W., Jurkiewicz J., (2001), *Mat. II Zjazdu Towarzystwa Biologii Rozrodu*, 55-56.
76. Plusa B., Grabarek J., Karasiewicz J., Modliński J. A., (2001), *Oncology Research*, 12, 286.
77. Kątska L., Bochenek M., Kania G., Ryńska B., Smorąg Z., (2002), *Theriogenology* (w druku).
78. Kopchick J. J., Jura J., Mukkerji P., Kelder B., (1995), *Biotechnologia*, 3 (30), 20-32.
79. Pursel V. G., Rexroad C. E. Jr., (1993), *J. Anim. Sci.*, 71(Suppl. 3), 10-19.
80. Solomon M. B., Pursel V. G., (1992), *J. Anim. Sci.*, (Suppl.) 69, 342.
81. Vilotte J. L., L'Huillier P., Mercier J. C., (1998), *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 3 (3), 351-362.
82. Pintado B., Goutierrez-Adan A., (1999), *Reprod. Nutr. Dev.*, 39(5-6), 535-544.
83. Stromqvist M., Houdebine M., Andersson J. O., Edlund A., Johansson T., Viglietta C., Puissant C., Hansson L., (1997), *Transgenic Res.*, 6(4), 271-278.
84. Bühler L., Friedman T., Jacomini J., Cooper D. K. C., (1999), *Frontier in Bioscience*, 4, 416-432.
85. DeMattos R. B., Bales K. R., Parsadanian M., O'Dell M. A., Foss E. M., Paul S. M., Holtzmann D. M., (2002), *J. Neurochem.*, 81 (2), 229-236.
86. Blackburn A. C., Jerry D. J., (2002), *Breast Cancer Res.*, 4 (3), 101-111.
87. Scott M. R., Supattapone S., Nguyen H. O., DeArmond S. J., Prusiner S. B., (2000), *Arch. Virol.*, (Suppl.), 16, 113-124.
88. Jura J., (1995), *Biotechnologia*, 3 (30), 20-32.
89. Rosochacki S. J., Snmirmov A., Kozikowa L., Sadowska J., Jefimow A., Zwierzchowski L., (1992), *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 9, 81-90.
90. Zwierzchowski L., Żebrowska T., Malewski T., Went D. F., (1994), *Proc. Eur. Conf. Embryo Rechr. & Genet. Engin in Cattle and Sheep*, (March 24-25), Kraków.
91. Jura J., Smorąg Z., Gajda B., Kareta W., Kopchick J. J., Kelder B., Prieto A. P., (2000), *Ann. Anim. Sci.*, 27, 4, 105-113.
92. Smorąg Z., Jura J., Kopchick J. J., Gajda B., Skrzyszowska M., Różycki M., Pasieka J., (1998), *Biotechnologia*, 2 (41), 145-152.
93. Jura J., Kopchick J. J., Chen W. Y., Modliński J. A., Reed M. A., Smorąg Z., (1994), *Theriogenology*, 41, 1259-1266.
94. Jura J., Kopchick J. J., Chen W. Y., Wagner W. Y., Modliński J. A., Reed M. A., Knapp J. R., Kątska L., Attal J., Houdebine L.-M., Smorąg Z., (1994), *Proc. Eur. Conf. Embryo Techn. An Engin in Cattle and Sheep*, Kraków, (24-25.03.1994), 169-183.
95. Rola M., Kuźmak J., Jura J., Bicka L., Skrzyszowska M., Gajda B., Smorąg Z., Glenn H., Cantor. *Bull. Vet. Inst. Puławy* (w druku).
96. Różycki M., Smorąg Z., Kopchick J. J., Chen W. Y., Jura J., Pasieka J., Orzechowska B., Gajda B., Skrzyszowska M., (1999), *J. Applied Genetic*, 40, 1, 29-37.