

**Zdzisław Smorąg,
Stefan Wierzbowski,
Lucyna Kątska,
Maria Skrzyszowska,
Barbara Gajda,
Jacek Błasiak**

Zakład Fizjologii Rozrodu
i Sztucznego Unasieniania Zwierząt,
Instytut Zootechniki
Balice k. Krakowa

Zwiększanie wydajności rozrodczej samic oraz manipulacje na gametach i zarodkach w hodowli i produkcji zwierzęcej

Ograniczone możliwości rozrodcze samic zwierząt gospodarskich, głównie bydła i owiec, są jednym z zasadniczych czynników limitujących postęp hodowli oraz wzrost produkcji zwierzęcej. Osiągnięcia endokrynologii powstałe w ostatnich kilkunastu latach stworzyły jednak pewne podstawy do sterowania procesem rozrodczym samic, w tym również lepszego wykorzystania ich potencjału rozrodczego. Także rozwój embriologii eksperymentalnej i stosowanie umożliwia opracowywanie metod o zasadniczym znaczeniu dla produkcji zwierzęcej.

W artykule przedstawione są najważniejsze metody praktycznego zastosowania oraz kierunki badawcze w zakresie biotechnologii rozrodu zwierząt gospodarskich.

I. Znaczenie metod sterowania procesami rozrodczymi samic dla podnoszenia produkcji zwierzęcej

Możliwość sterowania procesami rozrodczymi zwierząt gospodarskich stała się bardzo ważnym narzędziem w organizacji i intensyfikacji produkcji zwierzęcej. Do najnowszych metod z praktycznego punktu widzenia, opartych na znajomości procesów rozrodczych zwierząt, należą: 1) synchronizacja rui i zwiększanie liczby owulacji oraz 2) wywoływania rui i owulacji poza sezonem rozplodowym.

1. Synchronizacja rui

Główne korzyści praktyczne, jakie wynikają ze stosowania synchronizacji rui, dotyczą przede wszystkim ułatwień natury organizacyjnej w hodowli. Jest to bowiem metoda pozwalająca na wywołanie rui i owulacji w zaplanowanym z góry terminie. Dzięki temu ułatwione jest tworzenie grup technologicznych zwierząt, eliminowane są trudności organizacyjne spowodowane, np. zacieleniem bydła w różnym okresie.

Kluczową rolę w regulacji cyklu rujowego jest ciałko żółte, stąd kontrola cyklu rujowego zależy od możliwości stymulowania, albo hamowania funkcji ciała żółtego. Metodą synchronizacji rui opartą na stymulowaniu funkcji ciała żółtego, jest podawanie związków progestagenowych, dzięki czemu utrzymany jest ich odpowiedni poziom w organizmie. Druga metoda synchronizacji rui oparta jest na wywoływaniu luteolizy ciała żółtego. Osiągnąć to można poprzez enukleację ciała żółtego lub przez podanie oksytocyny, prostaglandyny, estrogenów, albo też przeciwciał LH.

W latach siedemdziesiątych użycie progestagenów stanowiło podstawowy sposób synchronizacji rui u bydła. Najczęściej stosowanymi wówczas związkami progestagenowymi w synchronizacji rui były: octan chlormadinonu (CAP), madroksyprogesteron (MAP) i octan melangestrolu (MGA) (1). Generalnie jednak wyniki synchronizacji przy użyciu wymienionych związków nie były w pełni zadowalające z powodu niskiego procentu zacielen w pierwszej zsynchronizowanej rui, co wynikało głównie z opóźnienia owulacji. Próby stosowania hormonów przyspiesza-

jących i uściślających czas owulacji, takich jak: hormonu luteinizującego (LH), estrogenów czy przypadkowych czynników uwalniających GnRH, dawały tylko nieznaczny efekt. Ponadto okazało się, że CAP i MGA przechodzą do mleka i mięsa, co spowodowało wycofanie tych związków przez niektóre kraje.

Stosunkowo szeroko stosowaną metodą synchronizacji rui u bydła stało się stosowanie jednego z licznych syntetycznych progestagenów czy progesteronu, w postaci wszczepów podskórnych, dopochwowych lub iniekcji domięśniowej w połączeniu z wprowadzeniem walerianu estradiolu lub benzoesanu estradiolu. Synchronizacja rui u bydła przy użyciu wymienionych metod była znacznym postępem w porównaniu z synchronizacją rui przy użyciu progestagenów podawanych doustnie. Na obecnym etapie spełnia ona w zasadzie warunki metody praktycznej, chociaż nie zawsze zapewnia zadowalającą powtarzalność uzyskiwanych wyników.

Najczęściej używanym progestagenem w praktyce synchronizacji rui u owiec, jest octan fluorogestonu (FGA) stosowany w postaci gąbek lub wkładek dopochwowych. Nowe możliwości synchronizacji rui u bydła, a w pewnym stopniu u owiec, otworzyły się po stwierdzeniu na początku lat siedemdziesiątych (2), że prostaglandyna $F_{2\alpha}$ jest związkiem o działaniu luteinizującym. Łatwość użycia, dobra efektywność działania, a także wyprodukowanie stosunkowo tanich syntetycznych analogów prostaglandyny, spowodowało, że związek ten jest obecnie najszerzej stosowany w synchronizacji rui u bydła. Użycie prostaglandyny dla synchronizacji rui, głównie u bydła, jak zaznaczono, wynika z jej właściwości luteinizujących. W związku z tym działanie prostaglandyny jest skuteczne, gdy zostanie ona podana w fazie lutealnej. W przypadku bydła prostaglandyna jest skuteczna między 5 a 10 dniem cyklu rujowego. Jeśli poda się prostaglandynę grupie zwierząt znajdujących się w dowolnej fazie cyklu rujowego, tylko część z nich zareaguje. Aby uzyskać synchronizację rui u wszystkich zwierząt stada, prostaglandyna podawana jest dwukrotnie w odstępach 10–12-dniowych (3). Płodność zwierząt synchronizowanych przy użyciu prostaglandyny $F_{2\alpha}$ jest na ogół zadowalająca, chociaż w niektórych przypadkach niższa od uzyskiwanej po unasienieniu w rui spontanicznej. Dla uzyskania poprawy stabilności wyników synchronizacji rui przy użyciu prostaglandyny $F_{2\alpha}$ aplikuje się ją w kombinacji z innymi związkami, takimi jak: progestageny, progesteron lub benzoesan estradiolu. Użycie prostaglandyny $F_{2\alpha}$ do synchronizacji rui u owiec, nie jest tak skuteczne jak u bydła, chociaż ma pewne zastosowanie praktyczne.

2. Zwiększanie liczby owulacji oraz wywoływanie rui i owulacji poza sezonem rozplodowym

Metody zwiększania liczby owulacji mogą prowadzić do uzyskania wielokrotnej liczby zarodków w jednym cyklu (superowulacji), bądź do nieznacznego wzrostu stopnia owulacji prowadzącego do poprawy plenności stada.

Metody superowulacji zostały przedstawione w rozdziale omawiającym stosowanie procedury przenoszenia zarodków. Tutaj omówimy możliwości umiarkowanego wzrostu owulacji. Głównie zastosowanie tych metod odnosi się do owiec. Obecnie istnieją trzy grupy metod pozwalających podwyższać stopień owulacji. Pierwsza grupa – opiera się na stosowaniu umiarkowanych dawek hormonów gonadotropowych, głównie PMSG. Użycie tej metody, zwłaszcza w połączeniu z synchronizacją rui przy użyciu progestagenów, może prowadzić do zwiększenia plenności stada. Jednakże trudno jest dziś przewidzieć jakie będą reakcje poszczególnych samic na podane hormony, co stanowi czynnik limitujący. Druga grupa metod dotycząca zwiększenia plenności owiec, oparta jest na wykorzystaniu procesów immunologicznych. Stwierdzono, że zarówno bierna jak i czynna immunizacja przeciw sterydom jajnikowym może zwiększyć stopień owulacji i prowadzić do uzyskania większej liczby potomstwa u owiec. Obecnie wydaje się, że stosunkowo wygodną metodą jest immunizacja owiec przeciw androstendionowi (4,5). Handlowy produkt o nazwie *Fecundin*, jest już stosowany na znaczną skalę w hodowli owiec w Australii i Nowej Zelandii. Osiągany wzrost plenności stada wynosi co najmniej 30%. Immunizację owiec można stosować również w połączeniu z synchronizacją rui. Wyniki otrzymane z dotychczas-

sowych doświadczeń nad stosowaniem immunizacji owiec nie wykazały – co istotne – negatywnego oddziaływania na ich plenność w kolejnych latach eksploatacji rozplodowej. Trzeba dodać, że metodę immunizacji można także stosować z powodzeniem dla zwiększenia odsetka porodów bliźniaczych u bydła (4). Trzecia grupa metod wiąże się z uzyskaniem zwiększonego stopnia owulacji u owiec (6) jest oparta na stosowaniu melationiny. Jest to hormon produkowany w szyszynce z zachowaniem dziennego rytmu syntezy. Traktowanie owiec egzogenną melationiną powoduje wzrost stopnia owulacji. Podawana w formie podskórnych implantów na 30–40 dni przed stanówką, prowadziła do zwiększenia średnio od 20 do 30 jagniąt na 100 owiec (6). Stosowanie melationiny umożliwia jednak przede wszystkim wywoływanie rui i owulacji u owiec poza sezonem rozplodowym. Praktyczna strona stosowania takiej regulacji cykliów to uzyskiwanie jagniąt w dowolnej porze roku.

II. Superowulacja i przenoszenie zarodków jako metody przyspieszania postępu genetycznego

Szacuje się, że na całym świecie w 1986 r. przeprowadzono od 200 000 do 250 000 przenieśnię zarodków u bydła (7). Wskazuje to na stosunkowo szybki rozwój stosowania metody, którą w praktyce zaczęto stosować z początkiem lat siedemdziesiątych. Metoda ta jest kosztowna, np. w Szwajcarii, w przypadku stwierdzonej ciąży, przy użyciu własnej dawczyni i biorczyń zarodków, właściciel płaci około 1000 Fr S.

Przydatność metody wynika w pierwszym rzędzie z możliwości zwiększania wydajności rododziej samic zwierząt jednorodnych, a to z kolei decyduje o lepszym wykorzystaniu potencjału genetycznego samicy i otwiera szansę bardzo istotnego przyspieszenia postępu hodowlanego. W początkowym okresie, superowulację i przenoszenie zarodków wykorzystywano dla zwiększania liczby potomstwa od wybranych kojarzeń w pierwszym rzędzie matek buhajów i grup rasowych, co – mimo rosnącej liczby przeprowadzonych zabiegów – miało w znacznej mierze charakter indywidualnych poczynąń, lecz z czasem zostało włączone do krajowych programów produkcji buhajów, np. w NRD. Natomiast od 1983 r. metoda została przyjęta jako podstawa nowej koncepcji programu hodowlanego określonego jako MOET (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*). Koncepcję taką zaproponowali Nicholas i Smith (8). Od tego czasu przybyło już cały szereg różnych wersji tego programu, które ogólnie dzieli się na zamknięte i otwarte programy MOET. W rezultacie oczekuje się rozwoju zamkniętych stad, względnie zespołów obór włączonych do określonego programu MOET, w których postęp hodowlany będzie bardzo szybki w stosunku do pozostałego pogłowia. W ramach programu MOET będą zatem produkowane buhaje, które dalej wykorzystywane zostaną, za pośrednictwem sztucznego unasieniania, do ulepszania pogłowia masowego. Dodatkową zaletą takiego rozwiązania jest to, że buhaje wprowadzane do inseminacji są już sprawdzone w ramach programu (na siostrach względnie półsiostrach). Usuwa to konieczność prowadzenia kosztownych, a w prymitywnych warunkach właściwie niemożliwych do realizacji, ewentualnie w najlepszym razie mało dokładnych ocen, dokonywanych na podstawie użytkowości potomstwa. W sposób najbardziej uproszczony można powiedzieć, że przyspieszenia postępu hodowlanego można oczekiwać w rezultacie lepszego wykorzystania potencjału genetycznego samicy oraz w efekcie zmniejszenia odstępu między pokoleniami, bowiem ocenę buhajów przeprowadza się na podstawie wydajności pełnych siostr i półsiostr. Pierwszy program oparty na tej koncepcji został uruchomiony w 1987 r. w Anglii, pod nazwą *Premier MOET Scheme* i realność tej inicjatywy została już potwierdzona, o ile jeszcze nie efektami genetycznymi, to na pewno wartością finansową przedsięwzięcia, które zostało zakupione za bardzo wysoką kwotę do dalszego prowadzenia w ramach *Milk Marketing Board*.

Warunkiem przydatności metod prowadzących do podnoszenia wydajności samic jest ich skuteczność. Stymulacja mnogiej owulacji jest już ustabilizowaną metodą, która pozwala na uzyskiwanie z jednego pobudzenia około 6–8 zarodków. Z tej liczby ocenia się najczęściej 4–6

zarodków jako nadające się do przeniesienia, a tutaj – zakładając 50–60% skuteczność, można oczekiwać 2–3 cieląt. Przyjmując możliwą do osiągnięcia wydajność rozrodczą krowy, można założyć, że w rezultacie trzykrotnej stymulacji w ciągu roku, uzyska się 15 zarodków z których po przeniesieniu do biorczyń, urodzi się 8 cieląt. Realność takich kalkulacji opiera się na wynikach, jakie uzyskiwano w praktyce przenoszenia zarodków u bydła w ostatnich latach i została potwierdzona wynikami otrzymanymi w realizowanych już programach MOET (9,10).

Podatność na pobudzanie do mnogiej owulacji wykazuje średnio 75% krów i wydaje się, że jest to naturalna granica, którą trzeba uwzględnić we wszystkich praktycznych założeniach hodowlanego wykorzystywania metody. Badania, jakie były i nadal są prowadzone nad doskonaleniem metody, przyniosły wyraźny postęp. Głównymi osiągnięciami, jak się wydaje, jest frakcjonowane podawanie FSH i neutralizowanie działania anty-PMSG przy zastosowaniu PMSG. Bardzo istotne znaczenie miałyby podniesienie liczby jakościowo dobrych zarodków oraz ograniczenie nie zapłodnionych oocytów. Wskazuje to na konieczność prowadzenia badań dotyczących dojrzewania oocytów, owulacji i zapłodnienia *in vitro*.

Zarodki wyplukuje się u bydła już wyłącznie metodą niechirurgiczną, na co pozwala łatwość przechodzenia szyjki macicznej, natomiast przenoszenie niechirurgiczne znajduje czasem zastosowanie alternatywne z przenoszeniem chirurgicznym. W praktyce *Premier MOET Scheme* (6) wykazano blisko 3% przewagę po chirurgicznym ET (62,5–65,3%).

Skuteczność przenoszenia zarodków układa się na poziomie 50–65% zakładając, że są to zarodki wyselekcjonowane morfologicznie, które nie wykazują odchyłań od normy. Osiągana skuteczność zależy od szeregu czynników. Można tu wymienić najważniejsze: zapewnienie właściwego środowiska (media) w okresie, kiedy zarodek pozostaje poza organizmem zwierzęcia, właściwa kwalifikacja zarodków, dobór odpowiednich biorczyń, a wreszcie – i może przede wszystkim – doświadczony, dokładny i odpowiedzialny, tj. gotowy do ponoszenia konsekwencji za swoje działanie zespół, który wykonuje całość prac, składającą się na zabieg określany jako „przenoszenie zarodków” (11).

III. Zamrażanie komórek jajowych i zarodków

Zamrażanie komórek jajowych i zarodków, a więc możliwość zatrzymania rozwoju całego organizmu na czas praktycznie nieograniczony, otworzyło szereg możliwości dla badań biologicznych i genetycznych. Równocześnie opanowanie tej metody przyniosło ułatwienie w praktycznym jej stosowaniu oraz stworzyło możliwości do realizacji nowych koncepcji hodowlanych. Ponadto, ułatwiło międzynarodową wymianę materiału genetycznego poprzez wprowadzenie obrotu zarodkami zamiast zwierzętami.

Opanowanie metod zamrażania zarodków ssaków wiąże się z postępem w zakresie kriobiologii, notowanym pod koniec lat sześćdziesiątych i na początku lat siedemdziesiątych (12, 13, 14). Szczególnie istotne okazały się te kierunki badań, które określały zależność przeżywania komórki po mrożeniu od takich czynników, jak jej wielkość, przepuszczalność błony komórkowej oraz rodzaju i koncentracji użytego związku osłaniającego (14). Najważniejszym odkryciem było dość precyzyjne obliczenie, potwierdzone późniejszymi wynikami doświadczeń, związku między wielkością komórki a szybkością jej schładzania. Z tych teoretycznych wyliczeń wynikało, że dla organizmu wielkości komórki jajowej ssaków, odpowiednie jest szybkie schładzanie, wynoszące około 1°C/min. W oparciu o te założenia Whittingham i wsp. (15) oraz Wilmut (16), jako pierwsi w 1972 r. uzyskali przeżywanie znacznego odsetka mrożonych zarodków mysich. Z prac tych wynikało, że najważniejszymi czynnikami decydującymi o wysokości stopnia przeżywania mysich zarodków są: wolne zamrażanie utrzymujące się w granicach od 0,2 do 2,0°C/min, wolne rozmrażanie, wynoszące od 4 do 25°C/min, oraz użycie dwumetylosulfotlenku (DMSO) jako związku osłaniającego. Stosując tę metodę, w nieco zmodyfikowanej formie (17,18), możliwe stało się skuteczne zamrażanie zarodków szeregu gatunków zwierząt gospodarskich, takich jak: bydło, owce, kozy, konie, a także zarodków człowieka. Nie udało się do-

tychczas zamrozić zarodków świni. Trzeba jednak podkreślić, że w wyniku procesu zamrażania, pewna liczba komórek zarodka ulega zniszczeniu, co obniża możliwości dalszego rozwoju mrożonych zarodków. Można przyjąć, że wyniki przenoszenia mrożonych zarodków bydłych i owczych są o około 20% niższe od tych, jakie uzyskuje się po przeniesieniu zarodków świeżych. Odnosi się to do zarodków w stadium moruli i blastocysty. Zamrażanie zarodków znajdujących się we wcześniejszych stadiach rozwojowych nastroża znacznie większe trudności.

Celem badań nad zamrażaniem zarodków, jakie przeprowadzono w kolejnych latach, było poszukiwanie efektywniejszych i prostszych metod mrożenia i rozmrażania. Do ważniejszych zmian, jakie wprowadzono do metod zamrażania, należą: zastąpienie DMSO przez glicerynę (19,20,21) oraz skrócenie czasu zamrażania (22,23). Jednak szczególnie ważnym rozwiązaniem, z punktu widzenia praktycznego, było opracowanie metody jednostopniowego usuwania związku osłaniającego po rozmrożeniu zarodka przy użyciu roztworu sacharozы (24,25).

Stosując metody zbliżone do używanych dla zamrożenia zarodków, stało się możliwe również zamrażanie nie zapłodnionych komórek jajowych myszy (26,27,28), szczura i chomika (26). Próby zamrażania niedojrzałych oocytów czy dojrzałych komórek jajowych bydła (29), wykazały ich niską przeżywalność po rozmrożeniu.

Przedstawione techniki wymagają stosowania urządzeń do kontrolowanego spadku temperatur, co w praktycznym stosowaniu metody stanowi pewną komplikację. Potrzeba taka nie występuje w przypadku zamrażania zarodka metodą wityfikacji. Jest to nowe podejście do problemu zamrażania, opierające się na rozpoznaniu, że skoncentrowane związki osłaniające rozpuszczone w PBS, schładzane do niskich temperatur stają się coraz bardziej lepkie i zestalają się w formie zeszlonej. W 1985 r. Rall i Fahy (30), a następnie Scheffen i wsp. (31) wykazali, że zarodki mysie mogą być z powodzeniem zamrażane metodą wityfikacji. Przed mrożeniem zarodki są poddawane kilkuminutowej ekwilibracji w roztworach stanowiących mieszaninę



Rys.1. Jagnięta urodzone po przeniesieniu wityfikowanych zarodków.

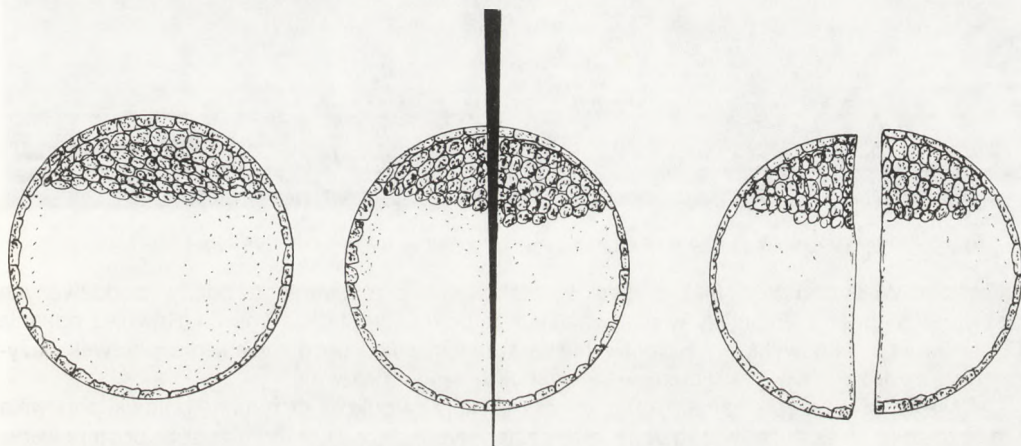
związków osłaniających, np. glicerolu i 1,2-propanediolu. Następnie, są umieszczane w mieszaninie witrifikacyjnej zawierającej wysoką koncentrację tychże związków, po czym zarodki są przekładane wprost z temperatury pokojowej do ciekłego azotu, lub par ciekłego azotu. Dotychczas metodą witrifikacji zostały zamrożone oprócz zarodków mysich, także zarodki innych gatunków ssaków, a mianowicie szczura (32), królika (33), owcy (34) i bydła (35).

Można zakładać, że w niedalekiej przyszłości witrifikacja stanie się powszechnie stosowaną metodą kriokonserwacji oocytów i zarodków ssaków.

IV. Bisekcja zarodków zwierząt gospodarskich

Bisekcja, czyli mikrochirurgiczne dzielenie zarodka na dwie części, jest metodą umożliwiającą uzyskanie monozygotycznego potomstwa z jednego zarodka. Poza aspektem praktycznym w postaci produkcji bliźniąt, metoda może znaleźć zastosowanie również w badaniach nad wczesnym rozwojem embrionalnym oraz implantacją. Metoda bisekcji zarodków może być ponadto wykorzystana do badań cytogenetycznych w tym również do oznaczania płci zarodka.

Schemat bisekcji blastocysty



Pierwsze próby uzyskiwania monozygotycznego potomstwa na drodze dzielenia moruli i blastocyst owczych, zostały przeprowadzone przez Trounsona i Moora (36). W wyniku tych prac uzyskano potomstwo z połówek zarodków, nie stanowiące jednak monozygotycznej pary. Przeprowadzone kilka lat później przez Meinecke-Tillmann podobne próby uwieńczone zostały sukcesem, doprowadziły bowiem do uzyskania identycznych bliźniąt.

W latach osiemdziesiątych wykonano szereg prac z zakresu bisekcji zarodków zwierząt gospodarskich, głównie bydłowych (38,39,40,41), ale także owczych (42,43), kozich (44), świńskich (45) i końskich (46). W wyniku tych prac, u wszystkich wymienionych gatunków zwierząt uzyskano już monozygotyczne potomstwo.

Warunkiem pełnego wykorzystania metody bisekcji w praktyce przenoszenia zarodków, jest uzyskiwanie rezultatów na wysokim i wyrównanym poziomie, co wiąże się z rozpoznaniem czynników wpływających na końcową efektywność. Jednym z ważniejszych czynników decydujących o pomyślnym rozwoju połówek zarodków, jest wyjściowa jakość zarodków. Badania Brema dowodzą (47), że zadowalające rezultaty można uzyskać tylko po przeniesieniu połówek otrzymanych z tych zarodków, o nie budzącym zastrzeżeń wyglądzie morfologicznym. Obniżona jakość zarodka wpływa drastycznie na pogorszenie wyników przenoszenia. Obserwowano także wpływ wieku zarodka poddawanego bisekcji na efektywność przeżywania dzielonych



Rys.2. Monozygotyczne jagnięta uzyskane po przeniesieniu blastocysty poddanej bisekcji.

zarodków. Williams i wsp. (41) uzyskali wyższe wyniki przeżywania zarodków poddawanych bisekcji w stadium blastocysty w porównaniu z zarodkami w stadium moruli. Również badania Chesnè i wsp. (42) wykazały wzrost odsetka kotnych owiec po przeniesieniu połówek otrzymanych z zarodków w bardziej zaawansowanych stadiach rozwoju.

W większości przeprowadzonych prac nad bisekcją zarodków, otrzymane połówki ponownie umieszczano w zastępczych osłonkach przejrzystych. Stosując ten sposób postępowania uzyskano u bydła efektywność przenoszenia na poziomie od 16 do około 70% (38,39,40,48). Umieszczenie połówek zarodków w zastępczych osłonkach przejrzystych jest zabiegiem dość skomplikowanym, dlatego też przenoszenie połówek pozbawionych osłonek przejrzystych („nagie połówki”) znacznie upraszcza zabieg bisekcji. Wyniki przenoszenia połówek nie umieszczonych w osłonkach przejrzystych wykazały możliwość uzyskania ich pełnego rozwoju *in vivo* (49,50,51).

Jednym z czynników gwarantujących pełny rozwój zarodka, jest obecność niezbędnej masy komórkowej. Z pracy Skrzyszowskiej i Smorąga wynika, że w trakcie bisekcji dochodzi do strat komórkowych wynoszących 13–16% (52). Zachodzi więc potrzeba stosowania technik ograniczających straty komórkowe w trakcie bisekcji.

Kolejnym czynnikiem, który może wpływać na skuteczność przenoszeń dzielonych zarodków, jest stosowanie hodowli *in vitro* połówek zarodków przed ich przeniesieniem. Baker i wsp. (53) stwierdzili, że czas hodowli dłuższy niż 4 godziny powoduje spadek przeżywalności zarodków po bisekcji.

O efektywności przenoszenia dzielonych zarodków mogą decydować nie tylko czynniki związane bezpośrednio z zarodkiem i warunkami bisekcji, lecz także jakość samic przeznaczonych na bioczynię. Podkreśla się tutaj między innymi potrzebę wyboru samic z dobrze wykształconym ciałkiem żółtym.



Rys.3. Monozygotyczne cielęta uzyskane po przeniesieniu blastocysty poddanej bisekcji.

V. Możliwości oznaczania i regulacji płci zarodków

U ssaków o płci decyduje gameta męska. Jeżeli plemnik zapładniający komórkę jajową przenosi chromosom Y, wtedy powstająca zygota jest samcem, a gdy zapłodnienie następuje plemnikiem posiadającym chromosom X – powstaje zarodek o genotypie żeńskim. Selekcja plemników ze względu na przenoszony chromosom płciowy pozwoliłaby na uzyskiwanie potomstwa o pożądanej płci. Dotychczasowe próby rozdzielania plemników oparte bądź to na zakładanych różnicach ich wielkości i ciężaru (54,55), bądź przy użyciu metod elektroforetycznych (56,57), czy eliminacji jednego typu plemników przez zmianę pH, ciśnienia osmotycznego lub poprzez użycie filtrów sefadeksowych (58,59) nie przyniosły oczekiwanych rezultatów.

W związku z rozwojem metod przenoszenia zarodków, zainteresowanie zostało skierowane na określenie płci zarodka przed jego wprowadzeniem do dróg rodnych zsynchronizowanych biorczyń. Pozyskane we wczesnym stadium rozwoju zarodki, mogą być poddawane analizie cytologicznej, a następnie przenoszone do dróg rodnych. Podstawą cytologicznych metod oznaczania płci zarodka jest dymorfizm chromosomów płciowych. Analiza chromosomalna komórek zarodka znajdujących się w stadium metafazy podziału mitotycznego, umożliwia określenie jego kariotypu. Identyfikując chromosomy płciowe określa się płeć zarodka.

W połowie lat siedemdziesiątych Hare i wsp. (60) jako pierwsi opracowali cytologiczną metodę określania płci 12–15-dniowych zarodków bydłych. W metodzie tej poprzez biopsję uzyskuje się komórki trofoblastu zarodka, które po krótkiej hodowli utrwala się i barwi, a następnie przeprowadza się ich analizę chromosomalną. Choć prawdopodobieństwo oznaczenia płci w ten sposób jest wysokie i wynosi około 70%, to metoda ta ma jednak poważne ograniczenia. Ze względu na znaczne rozmiary kilkunastodniowych zarodków, zarówno ich uzyskiwanie, jak i przenoszenie odbywać się musi przy zastosowaniu metody chirurgicznej. Wynikają

z tego znaczne utrudnienia praktyczne. Ponadto zarodków w tym stadium rozwoju nie można skutecznie zamrażać. Cytologiczne oznaczanie płci wcześniejszych tzn. 6–7-dniowych zarodków jest również możliwe. Dla określenia płci pobiera się w tym przypadku około 10–20 komórek. Konieczne jest jednak, aby indeks mitotyczny tych zarodków nie był niższy niż 10% (61). Dlatego głównym czynnikiem limitującym stosowanie tej metody jest liczba i jakość obserwowanych metafaz. Interesującą próbą oceny płci jest metoda analizy cytologicznej połączona z bisekcją morul lub blastocyst. W metodzie tej jedna z połówek zarodka poddawana jest analizie chromosomalnej, druga – przenoszona bezpośrednio lub zamrażana. Picard i wsp. (62,63) wykazali, że płeć może być oznaczona u 60% badanych zarodków, z czego ponad połowa przeżywa po przeniesieniu w stanie świeżym, a około 20% po zamrożeniu.

Kolejna, cytologiczna metoda określania płci zarodków polega na identyfikacji w komórkach żeńskiego zarodka zinaktywowanego chromosomu X, przekształconego w paleczkowaty twór, zwany ciałkiem Barra. Poprzez obserwację chromatyny płciowej, oznaczono dotychczas płeć 5-dniowych zarodków króliczych (64). Chociaż skuteczność oznaczania płci zarodków króliczych wynosiła 75%, szersze zastosowanie tej metody jest niemożliwe, ponieważ u zarodków innych gatunków ssaków identyfikacja ciała Barra jest bardzo utrudniona. W przypadku zwierząt gospodarskich dokładną obserwację uniemożliwia granularna natura cytoplazmy (65).

Podsumowując poczynione na ten temat rozważania trzeba stwierdzić, że wymienione cytologiczne metody oceny płci zarodków są w chwili obecnej zbyt skomplikowane, a ich skuteczność zbyt niska, aby mogły być stosowane w praktyce.

Oprócz analizy cytologicznej, stosowana jest także immunologiczna metoda określania płci zarodka. Opiera się ona na spostrzeżeniu, że w wysoko wsobnych szczepach myszy przeszczepy skórne pomiędzy poszczególnymi osobnikami są w dużym stopniu udane. Jedynie fragmenty skóry samca transplantowane na samicę są z reguły odrzucane. W związku z tym, że genetyczną różnicę między dawcą przeszczepu a biorcą jest brak u tego ostatniego chromosomu Y, przyczyną tej immunologicznej reakcji jest pewien specyficzny męski antygen, występujący na powierzchni komórek samca, czyli antygen H-Y. Antygen ten wykryto dotychczas w komórkach samców szeregu gatunków ssaków (65). Uważa się, że jest to czynnik pobudzający rozwój embrionalnej gonady w kierunku jąder (67). Antygen H-Y nie jest specyficzny gatunkowo, dlatego produkując przeciwciała przeciwko niemu poprzez immunizację samic wysoko wsobnego szczepu myszy komórkami śledziony samców tego samego szczepu oraz stosując metodę immunofluorescencyjną, można określić płeć zarodków innego gatunku ssaków. Tym sposobem wykrywano antygen H-Y na zarodkach bydłowych (66). Stosunkowo łatwo można było zidentyfikować w stadium blastocysty identyfikacja antygenu H-Y była znacznie utrudniona (66). White i wsp. (68) określali metodą immunologiczną płeć bydłowych zarodków od stadium 16-komórkowego do stadium blastocysty i wykazali, że około 85% badanych zarodków może być skutecznie oznaczanych. Podobną skuteczność określania płci otrzymano badając zarodki mysie oraz owcze i świńskie (69,70). Chociaż technika oznaczania płci metodą pośredniej reakcji immunofluorescencyjnej jest stosunkowo skuteczna oraz szybka, ze względu na możliwość sklasyfikowania dużej liczby zarodków w krótkim czasie nie jest stosowana rutynowo. Jedną z przeszkód jest obserwowane obniżenie żywotności zarodków po ich ekspozycji w surowicy odpornościowej (66). Okazało się również, że jakość zarodka jest czynnikiem mającym wpływ na typ i stopień fluorescencji. Słabe jakościowo zarodki, częściowo zdegenerowane, wykazują fluorescencję, która nie jest związana z ekspresją antygenu H-Y na zarodkach wraz z jego rozwojem, powoduje obniżenie praktycznej wartości metody.

Spośród innych metod określania płci zarodków na uwagę zasługują próby oparte na analizie metabolizmu. Stwierdzono bowiem niewielkie różnice między zarodkami męskimi i żeńskimi w intensywności niektórych procesów biochemicznych. Różnicę tę przypisuje się odmiennemu kompletowi chromosomów płciowych, występujących u poszczególnych płci. Na chromosomie X kodowanych jest wiele genów, których brak na chromosomie Y. Potencjalnie samica powinna więc produkować podwójną ilość sprzężonych z chromosomem X enzymów w stosunku do

wielkości produkowanej przez samca. Tak się jednak nie dzieje, gdyż w komórkach somatycznych samicy jeden z chromosomów X jest inaktywowany. Inaktywacja ta ma jednak miejsce dopiero w pewnym stadium rozwoju zarodka, zatem do momentu jej wystąpienia zarodki żeńskie wykazują dwukrotnie wyższą aktywność enzymów sprzężonych z chromosomem X w porównaniu do zarodków mysich (71,72). Stwierdzono, że w zarodkach myszy poziom α -galaktozydazy, fosforybozylotransferazy guanozyno-hypoksantynowej (HGPRT) oraz dehydrogenazy glukozo-6-fosforanowej (G6PD) jest zależny od liczby chromosomów płciowych (73).

Chociaż udało się już określić płeć zarodków metodami opartymi na różnicach aktywności wymienionych enzymów, to jednak głównym mankamentem tych testów jest zarówno niezadawalająca jeszcze ich skuteczność oraz negatywny wpływ na żywotność zarodków. Prowadzone są również próby oznaczenia płci zarodka przy wykorzystaniu metody polegającej na wykrywaniu męskich, specyficznych odcinków DNA (74,75,76). Ellis i wsp. (74) stosując do przeprowadzenia testu wyekstrahowany DNA, oznaczyli płeć u ponad 70% 6- i 7-dniowych zarodków bydlęcych, chociaż Vaimanowi i wsp. (76) nie udało się powtórzyć tych wyników.

Przedstawione metody pozwalają do pewnego stopnia na określenie płci zarodków ssaków. Najbardziej jednak interesującą z praktycznego punktu widzenia, metodą byłby skuteczny rozdział plemników ze względu na przenoszony chromosom płciowy, a tym samym regulacja płci na poziomie gamet. Praktyczne znaczenie stosowania metod regulacji płci w hodowli wynika co najmniej z dwóch powodów. Po pierwsze, możliwość dysponowania zmienioną na korzyść samic proporcją urodzonych zwierząt w stadzie wpływałaby korzystnie na uzyskiwane efekty genetyczno-hodowlane. Z drugiej strony, w przypadku przeznaczania zwierząt na rzeź, byłoby pożądane dysponowanie osobnikami męskimi. Przyrosty potomstwa męskiego są bowiem o kilkanaście procent większe od żeńskiego.

VI. Hodowla niedojrzałych oocytów i zapłodnienie *in vitro* jako metody produkcji gamet żeńskich i zarodków

Potencjał rozrodczy samicy, określanej liczbą pęcherzyków jajnikowych zawierających oocyty, może być pełniej wykorzystany przez zastosowanie metod dojrzewania i zapłodnienia tych oocytów w warunkach laboratoryjnych. W naszych badaniach (77) nad możliwościami uzysku oocytów bydlęcych u jałówek i krów w wieku do 8 lat, wykazaliśmy, że średnia liczba pęcherzyków jajnikowych o średnicy 2–6 mm wynosi 23 na sztukę. Liczba ta tylko nieznacznie zmniejsza się u krów w wieku 9 do 17 lat. Ponieważ część uzyskanych oocytów (40–50%) przejawia różny stopień zaawansowania zmian atretycznych (77), więc od jednej dawczyni możliwe jest uzyskanie w zależności od stosowanej metody uzysku, od 5 do 12 oocytów przydatnych do hodowli *in vitro*.

Możliwość spontanicznego dojrzewania oocytów ssaków *in vitro* po uwolnieniu ich z pęcherzyków jajnikowych, została wykazana przez Picusa już ponad 50 lat temu, jednakże dopiero od dwóch ostatnich dziesięcioleci obserwuje się znaczny wzrost zainteresowań tymi badaniami.

A. Dojrzewanie oocytów *in vitro*

Metoda hodowli niedojrzałych oocytów jest bardzo podobna dla wielu gatunków i wymaga spełnienia następujących warunków:

1. Dysekcja pęcherzyków jajnikowych (u bydła o średnicy 2–6 mm) dokonana w drodze:
 - a) aspiracji zawartości pęcherzyka za pomocą strzykawki i igły (najmniej wydajny sposób pozwalający na uzyskanie 40–45% oocytów (78), lub
 - b) rozrywania izolowanych pęcherzyków (78), czy też
 - c) nacinania powierzchni jajnika, prowadzącego do uwalniania oocytów z pęcherzyków.
2. Selekcja oocytów. Uzyskane oocyty poddawane są starannej selekcji morfologicznej, w efekcie której do hodowli przeznaczają się 50–60% oocytów (78). Celem tej selekcji jest elimi-

nacja oocytów wykazujących jakiegokolwiek oznaki atrezji tak w cytoplazmie oocytu, jak i w otaczających oocyt komórkach wzgórka jajonośnego.

3. Umieszczenie w hodowli. Wyselekcjonowane oocyty, otoczone komórkami wzgórka jajonośnego, są następnie przepłukiwane kilkakrotnie w pożywce i umieszczane w hodowli. Najczęściej stosowaną pożywkę stanowi obecnie podłoże TC 199, uzupełnione rujęw surowicą bydęcą (79,80) bądź surowicą płodową i dodatkami hormonalnymi (81,82). Ponadto, dodawana jest populacja komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego w ilości $1-5 \times 10^6/1$ ml pożywki (81,82,83). Niezmiernie ważnymi czynnikami prawidłowego przebiegu procesu dojrzewania są również osmolowość i pH pożywki, temperatura, wilgotność i odpowiedni skład atmosfery gazowej, a także czas hodowli.

Najłatwiej dostrzegalnym wskaźnikiem dojrzałości oocytu jest mikroskopowa obserwacja konfiguracji chromosomalnej stadium drugiej metafazy podziału mejotycznego i/lub obecność ciała kierunkowego. Jednakże manifestująca się w ten sposób dojrzałość jądra komórki, nie stanowi wystarczającego kryterium pełnej dojrzałości. Pełna dojrzałość oocytu wymaga bowiem syntezy odpowiednich białek cytoplazmy, które regulują procesy mejozy, dekondensację plemników, tworzenie męskiego przedjądra, zapoczątkowanie podziałów mitotycznych zygot i prawidłowy rozwój zarodkowy (84). Już w 1955 r. Chang (85) wykazał, że procesowi dojrzewania musi podlegać zarówno jądro oocytu jak i cytoplazma, a kolejne doświadczenia (86) przyniosły rozpoznanie, że w procesie dojrzewania cytoplazmy oocytu fundamentalną rolę odgrywają komórki ziarniste pęcherzyka jajnikowego, które modelują syntezę białek i/lub polipeptydów. Niepodważalnym dowodem na absolutną niezbędność komórek ziarnistych w procesie dojrzewania *in vitro* oocytów zwierząt gospodarskich, jest urodzenie się potomstwa w wyniku doświadczeń, w których dojrzewanie oocytów *in vitro* przeprowadzono w obecności komórek ziarnistych (80,81,82,87,88,89).

B. Przygotowanie plemników do zapłodnienia

Aby plemniki stały się zdolne do penetracji osłon jajowych, tj. komórek wzgórka jajonośnego i osłonki przejrzystej, muszą przejść kilkugodzinne procesy „uzdatniania”, które w warunkach naturalnych następują w żeńskich drogach rodnych. Procesy te, określane jako kapacytacja i reakcja akrosomalna, można również wywołać w warunkach laboratoryjnych. Reakcją akrosomalną można zdefiniować jako fuzję między zewnętrzną błoną akrosomu i błoną plazmatyczną plemnika, prowadzącą do uwolnienia zawartych w akrosomie enzymów trawiennych. Zdefiniowanie procesu kapacytacji jest natomiast zadaniem znacznie trudniejszym, bowiem nie obserwuje się w tym procesie żadnych zmian morfologicznych. Większość teorii na temat kapacytacji opiera się na założeniu, że błona cytoplazmatyczna plemnika w ejakulowanym nasieniu jest pokryta licznymi drobinami cholesterolu, białek i glikoprotein, które ją stabilizują. Działanie enzymów dróg rodnych prowadzi do usunięcia tych drobin z błony plazmatycznej okrywającej plemnik, co wywołuje zwiększenie jej płynności i przepuszczalności dla jonów Ca^{+2} (90,91,92).

Istnieje cały szereg substancji, jonów i innych czynników regulujących przebieg obu rodzajów reakcji. Oprócz wymienionych wcześniej enzymów dróg rodnych, wymienić tu należy kwasy β -aminowe (93), katecholaminy (94), albuminę (95), glukozaaminoglikansy GAGs (96,97), jony Ca^{+2} , Mg^{+2} , Na^+ , K^+ , Zn^{+2} , HCO_3^- (95), a także temperaturę środowiska (98,99). Kluczowym regulatorem przebiegu kapacytacji i reakcji akrosomalnej są jony Ca^{+2} (91,99,100). Wnikające do plemników jony Ca^{+2} stymulują fosfolipazy do produkcji lizofosfolipidów, powodują pęcznienie oraz fuzję błon plemnikowych, biorą udział w aktywacji proakrosyny i aktywności akrosyny, współdziałają z jonami Mg^{+2} , jako jeden z głównych mechanizmów regulujących przebieg reakcji akrosomalnej.

Istnieje cały szereg metod kapacytacji nasienia buhaja *in vitro*, jak:

- 1) kapacytacja w płynie hyperosmotycznym HIS (101,102);
- 2) długotrwała inkubacja (18-24 godzin) (103);
- 3) kapacytacja w obecności kofeiny (104,105);

- 4) przemywanie plemników w gradiencie percollu, następujące po inkubacji w podwyższonej koncentracji (106);
- 5) inkubacja w podwyższonym, нефизjologicznym pH (107);
- 6) inkubacja w obecności lizofosfolipidów (108);
- 7) inkubacja z heparyną (80,81,88,109,110,111);
- 8) inkubacja w płynie pęcherzykowym (112).

Dotychczas uzyskano cieleta i ciąży w tych przypadkach, gdy do zapłodnienia oocytów używano plemników kapacytowanych przy użyciu roztworu hipertonicznego (101,102), heparyny (80,81,88,109,110), kofeiny (104,105) oraz gradientu percollu (106). Mimo tej różnorodności metod kapacytacji nasienia buhaja wydaje się, że w chwili obecnej najbardziej skuteczną, pozwalającą na uzyskanie wysokiego – bo osiągniętego nawet powyżej 70% odsetka zapłodnień i powtarzalnych wyników, jest połączenie kapacytacji przy użyciu heparyny z rozdziałem plemników. Proces ten następuje przy zastosowaniu techniki „podpływania” *swim up*. Najbardziej ruchliwe plemniki podpływają w górne partie pożywki i te plemniki używane są do zapłodnienia. Istotną zaletą tej metody, szczególnie w porównaniu z metodą kapacytacji plemników w płynie hyperosmotycznym, jest jej wysoka efektywność przy kapacytacji nasienia mrożonego. Z praktycznego punktu widzenia – stanowi najbardziej pożądaną alternatywę dla przyszłego rozwoju metody zapłodniania *in vitro*.

Zapłodnienie

Dojrzałe oocyty umieszcza się w pożywce do zapłodnienia, dodając $1-1,5 \times 10^6$ plemników/1 ml. Następnie gamety inkubuje się razem przez 6–20 godzin, przy zachowaniu odpowiednich warunków termicznych (temp. 38–39° C), gazowych (5% CO₂ w powietrzu) i wilgotności. Po tym czasie oocyty przenoszone są do świeżej pożywki, oczyszczone z przylegających plemników i umieszczane w hodowli bądź przenoszone do jajowodów bioczny pośrednich na 5–7 dni.

Rozwój zarodkowy zygot

W chwili obecnej najlepsze wyniki rozwoju zarodkowego zygot bydłych obserwuje się po ich przeniesieniu na kilka dni do jajowodu bioczny pośredniej, którą może być krowa (101,109), owca (79,82,88) lub królik (88,102,105,111). Zabieg ten jest jednak kłopotliwy, gdyż wymaga dwukrotnej interwencji chirurgicznej, a ponadto w trakcie tych zabiegów część komórek jest gubiona. Stąd też prowadzone są intensywne poszukiwania kilkudniowej metody hodowli zarodków w warunkach *in vitro*. Ten etap pracy jest do tej pory ciągle jeszcze najbardziej newralgicznym punktem limitującym rozwój metody. Niską efektywność rozwoju wczesnych stadiów zarodkowych obserwuje się nie tylko w przypadku zarodków bydłych, dotyczy ona również zarodków innych gatunków ssaków, jak owca, świnia. Podejmowane są próby poprawy warunków hodowli przez prowadzenie współhodowli komórkowych z pęcherzykami trofoblastycznymi (113,114) z nabłonkiem jajowodu (105,115,116) lub macicy (117), komórkami wzgórką jajonośnego (28), komórkami owodni (105) czy też w hodowli w zapłodnionym jaju kurzym (118). Modyfikacje pozwalają wprawdzie na pewne zwiększenie liczby zarodków rozwijających się do stadium blastocysty, jednakże ciągle jeszcze nie znaleziono w pełni zadowalającego rozwiązania.

Możliwości wykorzystania zapłodnienia *in vitro*

Metoda zapłodnienia *in vitro* stwarza szereg możliwości praktycznego wykorzystania, a mianowicie:

1. Produkcja zarodków na potrzeby przenoszenia zarodków.
2. Produkcja zarodków o ściśle określonym stadium rozwoju dla uzyskania transgenicznego potomstwa.

3. Ocena zdolności zapładniającej nasienia (test penetracji pozbawionych osłonek przejrzystych jaj chomiczych).
4. Ocena kariotypu samca.
5. Użycie metody w przypadkach niektórych zaburzeń płodności związanych z jajowodem lub macicą.
6. Uzyskiwanie dużej liczby pólrodzeństwa w tym samym czasie.
7. Zapłodnienie mrożonych oocytów.

Literatura

1. Smorağ Z., Wierchoś E., (1980), Synchronizacja rui, superowulacja i transplantacja zarodków u bydła (przegląd literatury), CBR Warszawa.
2. Rowson L. E. A., Tervit R., Brand A., (1972), Proc. VIIIth Int. Congr. Anim. Reprod. A. I., München, 2, 865.
3. Cooper H. J., Furr B. J. A., (1976), The use of prostaglandins in the control of the bovine oestrus cycle, in: Egg Transfer in Cattle. Ed. E. E. A. Rowson, E. E. C. Conf. Luxembur.
4. Webb R., Morris B. A., (1988), Proc. XIth Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. Dublin, 5, 184.
5. Cognie Y., (1988), Proc. XIth Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. Dublin, 5, 193.
6. Symons A. H., Arendt J., Poulten A. L., English J., (1988), Proc. XIth Int. Congr. Anim. Reprod. A. I. Dublin, 5, 156.
7. Thibier M., (1988), Rapport de la 13^{eme} conference de la Commission Regionale de l'OIE pour l'Europe, 3-39.
8. Nicolas F. W., Smith C., (1983), Anim. Prod., 36, 341.
9. McGuirk B., (1989), The theory and application of nucleus breeding schemes in dairy cattle., Proc. ONBS-FAO, Białobrzegi.
10. Reklewski Z., Dymnicki E., Łukasiewicz M., (1989), The Polish MOET breeding experiment., Proc. ONBS-FAO, Białobrzegi.
11. Wierzbowski S., Smorağ Z., Wierchoś E., (1985), Przenoszenie zarodków u bydła, Instrukcja, Balice-Przysiek, 48.
12. Mazur P., Schmidt I., (1968), Cryobiology, 5, 1.
13. Mazur P., (1970), Science, 168, 939.
14. Mazur P., Leibo S. P., Farrant I., Chu E. H. Y., Hanna M. G. Jr., Smith L. H., (1970), Interaction of cooling rate, warming rate and protective additive on the survival of frozen mammalian cells, in: The Frozen Cell., 69, G. E. W. Wolstenholme and Maeve, O'Connor (eds.) Ciba Found. Symp. Londyn.
15. Whittingham D. G., Leibo S. P., Mazur P., (1972), Science, 178, 411.
16. Wilmut I., (1972), Science, 11, 1071.
17. Willadsen S. M., Polge C., Rowson L. E. A., Moor R. M., (1976), J. Reprod. Fert., 46, 451.
18. Willadsen S.M., Polge C., Rowson L. E. A., (1978), J. Reprod. Fert., 52, 2, 391.
19. Bilton R. I., (1980), Proc. 9th Inter. Cong. Anim. Reprod. A. I., Madryt, vol. II, 245.
20. Smorağ Z., Kańska L., Wierzbowski S., (1981), Some factors affecting the success of embryo freezing: storage before freezing, superovulation rate, PBS concentration, cooling and thawing rates, in: Frozen Storage of Laboratory Animals, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart-New York, 83.
21. Willadsen S. M., (1980), Proc. 9th Inter. Cong. Anim. Reprod. A. I., Madryt, vol. II, 255.
22. Smorağ Z., Kańska L., Wierchoś E., (1981), Anim. Reprod. Sci., 4, 65.
23. Willadsen S. M., (1977), Factors affecting the survival of sheep embryos during freezing and thawing, in: The freezing of mammalian embryos. Ciba Found. Symp., No 52, Elsevier, Amsterdam, 175-201.
24. Leibo S. P., (1984), Theriogenology, 21, 767.
25. Renard J. P., Heyman H., Ozil J. P., (1982), Ann. Med. Vét., 126, 23.
26. Parkening T. A., Chang M. C., (1977), Biology Reprod., 17, 527.
27. Tsunoda Y., Parkening T. A., Chang M. C., (1976), Experientia, 32, 323.
28. Whittingham D. G., (1976), J. Reprod. Fert., 49, 89.
29. Heyman Y., Smorağ Z., Kańska L., Vincent C., (1986), Cryo-Letters, 7, 170.
30. Rall W. F., Fahy G. M., (1985), Nature, 313, 573.
31. Scheffen B., Van Der Zwalmen P., Massip A., (1986), Cryo-Letters, 7, 260.
32. Kono T., Suzuki O., Tsunoda X., (1988), Cryobiology, 25, 170.

33. Smoraż Z., Gajda B., Wieczorek B., Jura J., (1989), *Theriogenology*, (w druku).
34. Gajda B., Smoraż Z., Wierzbowski S., Wieczorek B., Jura J., (1989), *Zuchthygiene*, (w druku).
35. Massip A., Van Der Zwalmen P., Ectors P., (1987), *Theriogenology*, 27, 69.
36. Trounson A. O., Moore N. W., (1974), *Aust. J. Biol. Sci.*, 27, 505.
37. Meinecke-Tillmann S., (1980), *Umschau*, 8, 248.
38. Baker R. D., (1985), *Theriogenology*, 23 (1), 3.
39. Ozil J. P., (1983), *J. Reprod. Fert.*, 69, 483.
40. Takeda T., Hallowell S. V., McCauley A. D., Hasler J. F., (1986), *Theriogenology*, 25 (1), 204.
41. Williams T. J., Elsdon R. P., Seidel G. E. Jr., (1984), *Theriogenology*, 22, 521.
42. Chesnè P., Colas G., Cognié Y., Guérin Y., (1987), Sévellec, Claude., *Theriogenology*, 27 (5), 751.
43. Gatica R., Boland M. P., Crosby T. E., Gordon I., (1984), *Theriogenology*, 21 (4), 555.
44. Tsunoda Y., Wakosu M., Yasui T., Sugie T., (1984), 10th Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. II, 249.
45. Nagashima H., Katch Y., Shibata K., Ogawa S., (1987), *Theriogenology*, 27 (1), 262.
46. Slade N. P., Williams T. J., Squires E. L., Seidel G. E. Jr., (1984), 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. II, 241, Urbana.
47. Brem G., Kruff B., Szilvassy B., Tenhumberg M., (1984), *Theriogenology*, 21 (1), 225.
48. Lambeth V. A., Looney C. R., Yoelkel S. A., Jackson D. A., Hill K. G., Godke R. A., (1983), *Theriogenology*, 20, (1), 85.
49. McEvoy T. G., Sreenan J. M., (1987), *Theriogenology*, 27 (1), 257.
50. Yoelkel S. A., Humes P. F., Godke R. A., (1984), 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. Urbana, 2, 251.
51. Skrzyszowska M., Znanięcki R., Bychawski S., Smoraż Z., (1988), *Med. Wet.*, 7, 412.
52. Skrzyszowska M., Smoraż Z., (1989), *Theriogenology*, (w druku).
53. Baker R. D., Eberhard B. E., Laffel R. E., Rohde R. F., Henschen T. J., (1984), 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem. (USA) Urbana, 2, 220.
54. Bhattacharya B. C., (1958), *Zuchtungsbiol.*, 72, 250.
55. Schiling E., Thormahlen D., (1976), *Proc. VIII Inter Congr. Anim. Reprod. A. J. Cracow* 4, 931.
56. Beaty R. A., (1972), *Vet. Rec.*, 90, 1.
57. Goodall H., Roberts A. M., (1976), *J. Reprod. Fert.*, 48, 433.
58. Bennevt D., Boyse E. A., (1973), *Nature*, 246, 308.
59. Zavos P. M., (1983), *Theriogenology*, 20, 235.
60. Hare W. C. D., Mitchell D., Betteridge K. J., Eaglesome M. D., Randall G. C. B., (1976), *Theriogenology*, 5, 243.
61. Singh E. L., Hare W. C. D., (1980), *Theriogenology*, 14, 421.
62. Picard L., King W. A., Betteridge K. J., (1984), *Theriogenology*, 21, 252.
63. Picard L., King W. A., Betteridge K. J., (1985), *Vet. Rec.*, 117, 603.
64. Gardner R. L., Edwards R. G., (1968), *Nature*, 218, 346.
65. Rowson L. E. A., (1974), *Vet. Rec.*, 95, 276.
66. Anderson G. B., (1987), *Theriogenology*, 27, 81.
67. Wahtel S. S., Ohne S., Koo G. C., Boyse E. A., (1975), *Nature*, 257, 235.
68. White K. L., Bradbury M. W., Anderson G. B., Bon Durant R. H., (1984), *Theriogenology*, 21, 275.
69. White K. L., Lindner G. M., Anderson G. B., Bon Durant R. H., (1982), *Theriogenology*, 17, 112.
70. White K. L., Anderson G. B., Paschen R. L., Bon Durant R. H., (1987), *J. Reprod. Immunol.*, 10, 27.
71. Kratzer P. G., Gartler S. M., (1978), *Nature*, 274, 503.
72. Rieger D., (1984), *Theriogenology*, 21, 138.
73. Epstein C. J., Smith S., Travis B., Tucker G., (1978), *Nature*, 274, 500.
74. Ellis S. B., Bondioli K. R., Williams M. E., Bryor I. H., Harpold M. M., (1988), *Theriogenology*, 29, 242.
75. Leonard M., Kirszenbaum M., Cotinot L., Chesne P., Heyman Y., Stinnakre M. G., Bishop C., Delouis C., Vaiman M., Follous M., (1987), *Theriogenology*, 27, 248.
76. Vaiman M., Cotinot C., Kirszenbaum M., Leonard M., Chesne P., Heyman Y., Stinnakre M. G., Bishop C., Fellous M., (1988), 3 *Congres Mondial de Reproduction et Selection des Ains et Bovins a Viande*, Paris.
77. Kańska L., Smoraż Z., (1984), *Anim. Reprod. Sci.*, 7, 451.
78. Kańska L. (1984), *Anim. Reprod. Sci.*, 7, 461.
79. Lu K. H., Gordon Y., (1987), *Annu. Conf. Soc. Study Fertil., Abstr.*, No 81.

80. Lu K. H., Gordon Y., Gallagher M., McGovern H., (1987), *Veterinary Record*, 121, 259.
81. Critser E. S., Leibfried-Rutledge M. L., Eyestone W. H., Northey D. L., First N. L., (1986), *Theriogenology*, 25, 150.
82. Lu K. H., Boland M. P., Crosby T. F., Gordon I., (1987), *Theriogenology*, 27, 251.
83. Gradl E., Lutterbach A., Brem G., (1988), 11th Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem., Dublin, 329.
84. Moor R. M., Gandolfi F., (1987), *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, 34, 55.
85. Chang M. C., (1955), *Science*, 121, 867.
86. Thibault C., Gerard M., (1973), *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 13, Suppl. 145.
87. Lu K. H., MacDonnell H. F., Gordon I., (1989), *Theriogenology*, 31, 222.
88. Ectors F. J., Van Der Zwalmen P., Tonati K., Beckers J. F., Ectors F., (1989), *Theriogenology*, 31, 188.
89. Fukui Y., Ono H., (1988), *Veterinary Record*, 122, 282.
90. Schapire B. M., Schackmann R. W., Gabel C. A., (1981), *Ann. ev. Bioch.*, 50, 815.
91. Bedford J. M., (1983), *Biol. Reprod.*, 28, 108.
92. Langlais J., Roberts K. D., (1985), *Gamete Res.*, 12, 183.
93. Meizel S., Lui C. W., Worthing P. K., Mrsny R. J., (1980), *Dev. Growth Differ.*, 22, 483.
94. Meizel S., Turner K. O., Thomas P., (1984), *Raven. Press.*, 329.
95. Meizel S., (1985), *Am. J. Anat.*, 174, 285.
96. Parrish R. F., Wincek T. J., Polakoski K. L., (1980), *J. Androl.*, 1, 89.
97. Handrow R. R., Lenz R. W., Ax R. L., (1982), *Biol. Reprod. Suppl.*, 1, 26, 83 A.
98. Aonuma S., Okabe M., Kawaguchi M., Kishi Y., (1980), *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 28, 1497.
99. Fleming A. D., Kuehl T. Y., (1985), *J. Exp. Zool.*, 233, 405.
100. Fleming A. D., Yanagimachi R., (1982), *J. Exp. Zool.*, 220, 109.
101. Brackett B. G., Donawick W. J., Evans J. F., Dressel M. A., (1982), *Biol. Reprod.*, 27, 147.
102. Sirard M. A., Lambert R. D., Menard D. P., Bedoya M. J., (1985), *Reprod. Fertil.*, 75, 551.
103. Wheeler M. B., Seidel G. E., (1986), *Theriogenology*, 25, 216, Abstr.
104. Goto K., Kajihara Y., Kosaka S., Koba M., Nakanishi Y., Ogawa K., (1988), *J. Reprod. Fertil.*, 83, 753.
105. Aoyagi Y., Fukui Y., Iwazumi Y., Urakawa M., Minogishi Y., Ono H., (1989), *Theriogenology*, 31, 168, Abstr.
106. Utsumi K., Katoh H., Iritani A., (1988), *Theriogenology*, 29, 320.
107. Cheng W. T. K., Moor R. M., Polge C., (1986), *Theriogenology*, 25, 146, Abstr.
108. Wheeler M. B., Seidel G. E., (1988), *Theriogenology*, 29, 325, Abstr.
109. Xu K. P., Greve T., Callesen H., Hyttel P., (1987), *J. Reprod. Fertil.*, 81, 507.
110. Stubbings R. B., Betteridge K. J., Basrur P. K., (1988), *Theriogenology*, 29, 313, Abstr.
111. Fukui Y., Ono H., (1988), *Veterinary Rec.*, 122, 282.
112. Fukushima M., Fukui Y., (1985), *Anim. Reprod. Sci.*, 9, 323.
113. Camous S., Heyman Y., Meziou W., Menezo Y., (1984), *J. Reprod. Fertil.*, 72, 479.
114. Heyman Y., Menezo Y., Chesne P., Camous S., Garnier V., (1987), *Theriogenology*, 27, 59.
115. Eyestone W. H., Vignieri J., First N. L., (1987), *Theriogenology*, 27, 228, Abstr.
116. Rexroad C. E., Powell A. M., (1988), *J. Anim. Sci.*, 66, 947.
117. Voolkel G. F., Amborski G. F., Hill K. G., Godke R. A., (1985), *Theriogenology*, 24, 271.
118. Blakewood E. G., Pool S. H., Wiemer K. E., Godke R. A., (1989), *Theriogenology*, 31, 176, Abstr.

Increase of reproductive performance of female and manipulation on gametes and embryos as basis for new methods in animal production

S u m m a r y

The paper presents the main practical methods and experimental subjects in the biotechnology of reproduction in farm animals: estrus synchronisation, induction of ovulation in anestrus ewe, increasing of reproductive performance in the ewe, superovulation and embryo transfer, oocyte and embryo preservation, embryo bisection, sex determination, in vitro maturation and fertilization of the oocytes.

Zdzisław Smorağ, Zakład Fizjologii Rozrodu i Sztucznego Unasienniania Zwierząt, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa.