

KATARZYNA ZIELIŃSKA

*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt Polskiej Akademii Nauk  
w Jastrzębcu*

## WYKORZYSTANIE TRANSPLANTACJI ZARODKÓW W HODOWLI ZWIERZĄT I BADANIACH NAUKOWYCH

Badania nad transplantacją zygot u ssaków zostały zapoczątkowane jeszcze w XIX wieku. W 1890 r. angielski badacz Heape, jako pierwszy dokonał udanego przeszczepu zarodka królika. Jednak właściwy rozwój tej dziedziny nauki rozpoczął się dopiero po II wojnie światowej. Transplantacja zarodków u zwierząt laboratoryjnych stała się już rutynową techniką w wielu badaniach genetycznych, fizjologicznych, fizjopatologicznych lub związanych z rozrodem. Stosuje się również przeszczepianie zarodków u zwierząt gospodarskich. Zastosowanie omawianej metody otwiera przed hodowlą nowe możliwości, a w szczególności:

- zwiększenie liczby potomstwa wybitnie wartościowych genetycznie samic, które rodzone będzie przez zdrowe, lecz mniej doskonałe „mamki”, jak również ułatwienie hodowli rzadkich ras w czystości i z uniknięciem inbredu,
- umożliwienie wzmoczenia intensywności selekcji hodowlanej samic,
- zwiększenie zakresu i ułatwienie oceny wartości hodowlanej samic na podstawie większej liczby potomstwa,
- skrócenie odstępu między pokoleniami dzięki uzyskaniu komórek jajowych od niedojrzałych płciowo samic poddanych uprzednio zabiegom hormonalnym,
- uzyskanie większej liczby ciąży bliźniaczych, co jest szczególnie cenne u bydła ras mięsnych,
- osiągnięcie zarówno wysokiej produkcji mlecznej jak i mięsnej w jednym stadzie dzięki przenoszeniu zarodków od krów typu mięsnego (dawczyni) do krów mlecznych (biorczyń),
- usprawnienie transportu zwierząt, które przewożone będą w stadium embrionalnym dzięki opracowaniu techniki przechowywania zarodków.

Zabieg transplantacji polega na pobraniu od samicy—dawczyni jaj, najczęściej po wywołaniu u niej superowulacji i zdeponowaniu ich w narządach rodnych biorczyń o zsynchronizowanym cyklu płciowym.

Prowadzi się obecnie intensywne prace badawcze nad udoskonaleniem poszczególnych etapów przeszczepiania zarodków. Dąży się do maksymalnego uproszczenia tego zabiegu, tak aby skutecznie można było stosować go na szeroką skalę również w warunkach fermowych.

W celu otrzymania jak największej liczby komórek jajowych od jednej samicy—dawczyni stosuje się hormonalne pobudzenie jajników, dające w efekcie zwiększenie liczby owulacji. Stosowane są różne sposoby wywoływania superowulacji u różnych gatunków zwierząt. Smith i Engle [za 34] stwierdzili, że iniekcja ekstraktu gruczołów śluzowych zwiększa liczbę równocześnie dojrzewających pęcherzyków Graafa u myszy. Nie otrzymuje się natomiast takiego efektu w przypadku zwierząt o cyklicznej owulacji, po podaniu hormonów gonadotropowych. Tylko w określonych fazach życia, tj. w okresie przed osiągnięciem dojrzałości płciowej oraz w ciąży samice reagują na iniekcję gonadotropin wystąpieniem superowulacji. Przeżywalność zygot uzyskanych tą drogą jest jednak niewielka, dla niedojrzałych płciowo — 14,2%, dla ciężarnych — 20%. Jak podaje Maurer [21] podawanie FSH i LH powodowało superowulacje u królic, a liczba wytwarzanych komórek jajowych była odwrotnie proporcjonalna do wieku i kolejnej owulacji. Ten sam autor [19] zajął się również problemem żywotności i zdolności do dalszego rozwoju komórek jajowych otrzymanych drogą superowulacji. Samicom podawano FSH i LH lub PMSG i HCG, a pobrane jaja porównywano z otrzymanymi z owulacji naturalnych na drodze transplantacji. Nie zanotowano istotnych różnic w procencie ciąży rozwijających się z komórek pochodzących z superowulacji w stosunku do płodności zwierząt kontrolnych. Hormonalne pobudzenie jajników nie powodowało więc zmniejszenia zdolności podziału i rozwoju komórek jajowych, skoro średnio 54,5% jaj otrzymanych z superowulacji rozwinęło się w płody.

U bydła występują zazwyczaj pojedyncze owulacje, chociaż znane są wypadki urodzenia przez krowę trzech, czterech, a nawet siedmiu cieląt [7]. Ważne jest, aby od wartościowej genetycznie krowy uzyskać jak najwięcej komórek jajowych. Potencjalne możliwości są duże. W jajnikach 3-miesięcznej cieliczki znajduje się około 75 tysięcy pęcherzyków pierwotnych [18] i chociaż z wiekiem liczba ta spada, w dalszym ciągu wspomniane możliwości są kilka tysięcy razy większe od przeciętnej liczby cieląt urodzonych przez krowę.

Skutecznie superowulacje wywołuje się wieloma sposobami, głównie przez podawanie [7]:

- 1) PMS w 4—10 dni po rui, a po 4 dniach usunięcie ciała żółtego,
- 2) PMS w 16—18 dni po rui,

3) ekstraktu gruczołów śluzowych konia przez 3 kolejne dni w 14—20 dni od wystąpienia rui,

4) PMS w środku cyklu płciowego.

Wydaje się, że trzecia metoda daje najlepsze rezultaty. Średnio otrzymano tą drogą 6,5 owulacji u krowy (maksymalnie 25 owulacji) i 90% pobranych komórek było zapłodnionych.

Onuma [27] wywołał superowulacje u 9-tygodniowych cieliczek stosując FSH, a następnie LH poprzedzone lub nie iniekcją PMSG. W przypadku użycia serogonadotropiny znacznie wzrosła liczba owulacji (średnia 15,4) w stosunku do zabiegów, gdzie nie podawano tego hormonu (średnia 3,8). Sugie [44] wywoływał u jałówek superowulacje przez podanie hormonów gonadotropowych, PMS i HCG. Inni autorzy [42, 43] przez stosowanie analogów prostaglandyn (np. F<sub>2</sub>) łącznie z PMSG otrzymali od dawczyń średnio ponad 6 zapłodnionych jaj.

Ważne jest aby hormonalnie pobudzając jajniki stosować optymalne dawki odpowiednich preparatów. Stanowi to jednak pewną trudność. Zbyt małe dawki nie wywołują pożądanych efektów, przedawkowanie zaś powoduje produkowanie przez zwierzęta zwiększonej liczby gamet niezdolnych do rozwoju. Nie wszystkie zwierzęta reagują również jednakowo na zabiegi hormonalne. Różnice mogą być spowodowane wiekiem zwierzęcia, rasą, porą roku, sposobem utrzymania itp. Istnieje w tym zakresie także duża zmienność osobnicza [11]. Około 31% zwierząt nie reaguje na zabiegi hormonalne w sposób zadowalający. Często jest to wynikiem nieprawidłowości w budowie dróg rodnych, co zwykle można stwierdzić drogą badania rektalnego. Przy wyborze krów — dawczyń — pewnym wskaźnikiem może być poziom GOT i cholesteroli u metabolicznie zdrowych osobników [11]. Wykazuje on pewną dodatnią korelację z późniejszą reakcją na zabiegi hormonalne w celu uzyskania superowulacji.

Pozyskiwanie komórek jajowych (zwykle zapłodnionych) z dróg rodnych dawczyni odbywa się poprzez przepłukiwanie jajowodów (wcześniejsze stadia rozwoju zygoty) lub z macicy (późniejsze stadia) odpowiednimi płynami. Zwykle są to: roztwór fizjologiczny [44], płyn Ringera [15], rozcieńczona surowica krwi homologiczna lub heterologiczna dla danego gatunku [4, 5, 45], stosowane są również płyny TCM 199 (Tissue Culture Medium), BMOC<sub>3</sub> (Brinsters Mouse Ova Culture Medium), PBS (Phosphate Buffered Saline Solution) lub płyn Parkera [18].

Pierwsze próby pobierania jaj odbywały się bezpośrednio po zabiciu dawczyń i wypreparowaniu narządów rozrodczych. Sposób ten stosuje się dotychczas dosyć często w doświadczeniach, gdzie materiałem są małe zwierzęta laboratoryjne (myszy, szczury).

Obecnie rozwijane są metody pobierania komórek jajowych z zachowaniem zwierząt przy życiu. Ma to szczególne znaczenie w przypadku dużych zwierząt gospodarskich. Zabiegi wykonuje się metodami chirurgicznymi i niechirurgicznymi. Za pomocą metod chirurgicznych można uzyskać nawet 100% komórek jajowych powstałych w jajnikach [18]. Są to jednak zabiegi drogie i skomplikowane. Polegają one na przecięciu powłok ciała, dostaniu się do jajowodu lub macicy i wypłukaniu jaj. Zabiegu tego można dokonać na drogach rodnych w ciele samicy lub amputowanych.

Obecnie dąży się do opracowania prostych, skutecznych sposobów pozyskiwania komórek jajowych metodami niechirurgicznymi, choć nie dają one jeszcze tak dobrych efektów jak zabiegi operacyjne. Dokonuje się więc płukania macicy *via cervix* za pomocą specjalnie do tego celu skonstruowanych przyrządów np. Rowsona i Dowlinga [7], jednak nawet przy bardzo ostrożnym wypłukiwaniu jaj możliwość ich uszkodzenia jest nadal duża [49]. Zabiegi takie wykonywane są głównie na krowach, ale eksperymentalnie również na kłaczkach [25].

Najczęściej pobierane są już zapłodnione komórki jajowe, chociaż spotyka się w literaturze dane odnośnie pobierania jajeczek operacyjnie już z pęcherzyków Graafa [2]. Zazwyczaj podczas rui zwierzęta są zapładniane i dopiero po odpowiednim czasie, zależnie od założonej metodyki doświadczenia, poddawane są odpowiedniemu zabiegowi.

Runner i wsp. [34] pobierali od myszy niezapłodnione komórki jajowe bezpośrednio po owulacji (0—8 godzin). Najlepsze wyniki dała transplantacja jaj najwcześniej pozyskanych (0—2 godziny). Podobnie Miyamoto i wsp. [22] pobierali komórki krótko po wystąpieniu owulacji, zapłodnienie następowało *in vitro*, jednak odsetek rozwijających się zygot był bardzo niski 13%.

Jak stwierdziła Kardymowicz (za Włodarską 49) zygoty królicze w 25 godzin po pokryciu są w stadium 2 blastomerów, a w 26,5 godziny w stadium 4 blastomerów. Z narządów rodnych królików komórki jajowe wypłukiwane mogą być w różnym czasie. Harper [12] wypłukiwał jaja już w 12—15 godzin po owulacji, a więc jeszcze przed rozpoczęciem ich podziału. Inni [20] w stadium 2—4 blastomerów lub w dalszych fazach podziału [1, 7, 37, 46] na 2—4 doby po owulacji. Czynnione są również próby pozyskiwania komórek jajowych królików w późniejszych stadiach rozwoju. Witenberger-Torrés [48] pobierał 5,5-dniowe zarodki, a Chang [5] nawet w 6 dni po zapłodnieniu. Przeżywalność zarodków nie jest wtedy duża, jednak metoda ta może mieć duże znaczenie, ponieważ jaja w tej fazie znajdują się już w macicy, można więc łatwiej stosować niechirurgiczne metody transplantacji.

Loginowa i wsp. [17] pobierał od owiec zarodki w stadium 2 do 8



blastomerów w 28—52 godzin po zapłodnieniu. W tym samym mniej więcej czasie Sijacki [36] wyplukiwał komórki jajowe z narządów rodnych świń (33—52 godziny po pokryciu). Natomiast Hunter [13] pobierał od loch zygoty w 7—9 dni po unasiennieniu. Oguri [26] dokonywał pobrania zarodków od klaczy w 6—7 dni po owulacji, a w innym doświadczeniu [27] po 5—10 dniach. Transplantacje wykonane były metodą niechirurgiczną.

Od krów i jałówek zabieg wyplukiwania komórek jajowych stosuje się najczęściej w granicach od 2 do 8 dni po zapłodnieniu [7, 15, 16, 24, 30, 32, 40, 42, 44]. Jak podaje Mc Laren [15] najlepsze wyniki otrzymano w przypadku transplantacji 6-dniowych zygot.

Czynione są również próby zapładniania pobranych komórek jajowych *in vitro* [2, 22]. Procent rozwijających się w ten sposób otrzymanych zygot nie jest jeszcze wysoki, w doświadczeniu Miyamoto [22] wynosił on 13%, a u Bracketta [2] — 22,6%.

Większość wykonywanych transplantacji jaj odbywa się bezpośrednio po ich pobraniu. Wymaga to obecności bioreczeni o zsynchronizowanym w stosunku do dawczyń cyklu płciowych [9, 33, 49, 50]. Synchronizację rui osiąga się stosując prostaglandynę F<sub>2α</sub> lub analogi prostaglandyny [33], iniekcję progesteronu lub przez wyłuszczenie ciała żółtego [9]. U świń dodaje się w tym celu do paszy substancję hamującą owulację (metallibur), a następnie wycofuje ją stosując równocześnie iniekcję hormonów gonadotropowych [50]. W Australii opracowano bardzo skuteczną metodę wywoływania rui u owiec w określonym czasie. Polega ona na stosowaniu gąbek pochwoowych [49].

Zsynchronizowanie stanów fizjologicznych dawczyni i bioreczeni ma szczególnie duże znaczenie u małych zwierząt (myszy, szczury), u których występują krótkie cykle płciowe oraz szybka implantacja zarodków w macicy [49]. Jednak u dużych zwierząt gospodarskich, gdzie ruje powtarzają się w większych odstępach czasu, a zagnieżdżenie jaja następuje później, czynnik ten odgrywa również dużą rolę [13, 23, 28, 29, 31, 32, 33, 38, 41, 42, 43, 50]. U jałówek Rowson i wsp. [32] ustalili, że podczas gdy ruje dawczyń i bioreczeni zostały zsynchronizowane, 91% spośród nich było cielnym po przeprowadzeniu zabiegu transplantacji zygot. Natomiast, gdy ruja u bioreczeni następowała 3 dni wcześniej lub później, odsetek ten zmalał odpowiednio do 0 i 20%. Podobną zależność wykrył Doyle [8] u myszy. Najwyższą płodność obserwowano po przeszczepieniu komórki jajowej do samic o zsynchronizowanej rui. Zygoty nie rozwijały się, gdy owulacja była u dawczyń później niż u bioreczeni. Natomiast embriony o 1—2 dni starsze niż stadium macicy, do której następował transfer rozwijały się. Jak podaje Chang [4] u królików występuje podobna prawidłowość.

Istnieje jednak zawsze groźba naruszenia równowagi hormonalnej organizmów wskutek podawania preparatów służących synchronizacji cykli płciowych [41]. Czynione są więc próby przechowywania jaj, aby w odpowiednim czasie przeprowadzić ich transfer do narządów rodnych biorecipientów. Już w 1929 roku Revis i Gregory (za Brinster 3) opracowali skuteczną metodę inkubacji w sztucznych warunkach zapłodnionych jaj króliczych od stadium jednej komórki i do blastocysty. Zygoty przechowywano w różnych roztworach zawierających surowicę krwi. Od tego czasu odkryto więcej rodzajów roztworów, w których zachodzić może rozwój komórek jajowych. Mogą to być płyny zawierające białko jaja kurzego, glukozę, albuminy surowicy krwi i inne [3, 20, 45]. Bardzo dobrą metodę przechowywania jaj opracował Brinster [3]. Użyty przez niego roztwór zawierał oprócz licznych substancji chemicznych również antybiotyki i krystaliczną surowicę bydlęcą. 60—100% zygot w stadium 2 blastomerów rozwinęło się w tych warunkach aż od późnej blastocysty. Kane [14] stwierdził, że rozwój zapłodnionych komórek jajowych królika zachodzi również w roztworze glukozy z aminokwasami z dodatkiem surowicy bydlęcej.

Przechowywanie komórek jajowych ssaków *in vitro* możliwe jest jednak tylko przez krótki czas. Maurer [20] dowiódł, że zdolność zarodków królika do rozwoju maleje wprost proporcjonalnie do czasu ich przechowywania w surowicy z dodatkiem glukozy.

Rozwój zygot zwierząt gospodarskich możliwy jest również w drogach rodnych samic innych gatunków. Najczęściej do tego celu używane są królice [7, 16, 17]. Samicę pokrywa się odpowiednio wcześniej wazektomowanym samcem w celu przygotowania środowiska macicy do przyjęcia zarodków. W doświadczeniu Lawsona [16] przeżywalność zarodków krowy wynosiła 85% po 2—4 dniach przebywania w jajowodzie królicy.

Obie wspomniane metody dają jednak możliwości przechowywania jaj tylko przez kilka dni. Prowadzone są więc badania nad przechowywaniem jaj przez dłuższy okres w obniżonych temperaturach, podobnie jak przy konserwacji nasienia buhajów. Próby mrożenia żeńskich gamet ssaków nie dały pozytywnych wyników. Z powodzeniem zamrażano jedynie komórki jajowe niższych form zwierząt. Proces ten przebiegał w cieczech z dodatkiem glicerolu [31, 35]. Jak podaje Sherman [35] przeżywalność jaj króliczych po przechowywaniu w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  wahała się w granicach 20—30%, a gdy temperaturę obniżono do  $-190^{\circ}\text{C}$  tylko 1% ulegał podziałom po ogrzaniu. Podobne wyniki osiągnięto w przypadku gamet myszy [35]. Istnieją dwie metody ochładzania komórek jajowych: szybka i opóźniona [40]. Z literatury wy-

nika, że ten drugi sposób, polegający na stopniowym obniżaniu się temperatury, daje lepsze rezultaty.

Zależnie od stadium rozwoju zarodków przeszczepia się je do jajowodu względnie do macicy biorczyni. Najczęściej wykonuje się to operacyjnie. Przy transferze zarodków do macicy samicy istnieje również możliwość zastosowania metody niechirurgicznej. Specjalnie skonstruowane w tym celu przyrządy, podobne do używanych przy zabiegu sztucznego unasienniania, pozwalają na umieszczenie zarodków w macicy *via cervix* [25, 44]. Nie bez znaczenia jest właściwe rozmieszczenie zarodków w macicy. U krów należy umieszczać po 1 zarodku w każdym rogu [10, 30, 31, 39]. Można również zdeponować po 2 jaja w rogu macicy od strony ciała żółtego, jednak straty w tym przypadku są większe [30]. Obserwuje się również wtedy czasami migrację komórek jajowych do przeciwległej strony macicy.

Wyniki doświadczeń nad transplantacją zygot są wysoce zachęcające. Angielscy badacze stosując tę metodę uzyskali zacielenia aż u 91% krów. Jest to wyższy wskaźnik niż w optymalnych warunkach krycia naturalnego [47]. Wielu autorów zauważyło również, że pod wpływem zmiany warunków rozwoju prenatalnego zwiększa się żywotność zwierząt [49]. Kwaśnicki (za Włodarską 49) podaje, że przeżywalność królików urodzonych z transplantacji do czasu odsadzenia była znacznie wyższa niż w grupie kontrolnej.

Poza omówionymi we wstępie możliwościami wynikającymi z zastosowania metody przeszczepiania zygot, istnieją również inne, będące jeszcze w fazie eksperymentów. Jedną z nich to możliwość otrzymywania bliźniąt jednojajowych na drodze izolacji blastomerów we wczesnych fazach rozwoju zarodka. Będzie można również określić płeć embrionu przez badanie jego kariotypu na drodze biopsji i zależnie od potrzeb zwiększać liczbę urodzeń samic lub samców. Możliwe też będzie badanie garnituru chromosomów i eliminacja osobników obarczonych wadami czy chorobami ustrojowymi.

Reasumując należy stwierdzić, że transplantacja komórek jajowych stwarza duże szanse zarówno w dziedzinie badawczej, jak i w hodowli i na pewno w dalszym ciągu będzie rozwijana i udoskonalana.

#### LITERATURA

1. Adams C.E.: The fate of fertilized eggs transferred to the uterus or oviduct during advancing pseudopregnancy in the rabbit. *J. Reprod. Fert.* 26, 1, 99—111, 1971.
2. Brackett B.G., Mills J.A., Jeitles G.G.: *In vitro* fertilization of

- rabbit ova recovered from ovarian follicles. *Fertility a. Sterility* 23, 12, 898—909, 1972.
3. Brinster R.L.: A method for *in vitro* cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst. *Exp. Cell Res.* 32, 205—208, 1963.
  4. Chang M.C.: Development and fate of transferred rabbit ova or blastocyst in relation to the ovulation time of recipients. *J. exper. Zool.* 114, 197—226, 1950.
  5. Chang M.C.: Transplantation of rabbit blastocyst at late stage: probability of normal development and viability at low temperature. *Science* 111, 544—545, 1950.
  6. Chang M.C., Casas J.H., Hunt D.: Development of ferret eggs after 2 to 3 days in the rabbit fallopian tube. *J. Reprod. Fert.* 25, 1, 129—131, 1971.
  7. Dowling D.F.: Problems of the transplantation of fertilized ova. *J. agricult Sc.* 39, 374—395, 1949.
  8. Doyle L.L., Gates A.H., Noyes R.W.: Asynchronous transfer of mouse ova. *Fertility a. Sterility* 14, 2, 215—220.
  9. Döcke F.: Superovulation und Eitransplantation beim Haustier. *MH. vet. Med.* 18, 3, 92—97, 1963.
  10. Fulka J.: K Přenosu časných embryí u hospodářských zvířat. *Naš Chor* 35, 5, 150—152, 1975.
  11. Hahn J., Traub J., Agthe O., Kolm A.P., Lotthammer K.H.: The importance of preselection of donor animals to improve bovine egg production. VIII-th Int. Cong. Anim. Rep. Artif. Insem. Kraków, 251—252, 1976.
  12. Harper M.J.: Stimulation of sperm movement from the isthmus to the site of fertilization in the rabbit oviduct. *Biol. Reprod.* 8, 3, 369—377, 1973.
  13. Hunter R.H.F., Polge C., Rowson L.E.A.: The recovery, transfer and survival of blastocysts in pigs. *J. Reprod. Fert.* 14, 3, 501—502, 1967.
  14. Kane M.T., Foote R.H.: Culture of two- and four-cell rabbit embryos to the expanding blastocyst stage in synthetic media. *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.* 133, 921—925, 1970.
  15. McLaren A., Michie D.: Studies on the transfer of fertilized mouse eggs to the uterine foster — mothers. *J. exper. Biol.* 33, 394—416, 1956.
  16. Lawson R.A.S., Rowson L.E.A., Adams C.E.: The development of cow eggs in the rabbit oviduct and their viability after re-transfer to heifers. *J. Reprod. Fert.* 28, 2, 313—315, 1972.
  17. Loginiva N.V., Donskaja V.I., Sipko A.A.: Ob inkubacii zygot mlekopitajuscich v organizme samok inogo vida. *Vest. Sel'sk.-choz. Nauki, Moskva* G14, 12, 72—73, 1969.
  18. Marcinkowski K.: Transplantacja zygot. *Prz. hod.* 10, 11—13, 1977.
  19. Maurer R.R., Hunt W.L., Van Vleck L.H., Foote R.H.: Developmental potential of superovulated rabbit ova. *J. Reprod. Fert.* 15, 171—175, 1968.
  20. Maurer R.R., Onuma H., Foote R.H.: Viability of cultured and transferred rabbit embryos. *J. Reprod. Fert.* 21, 3, 417—422, 1970.
  21. Maurer R.R., Foote R.H.: Maternal ageing and embryonic mortality in the rabbit. *J. Reprod. Fert.* 25, 329—341, 1971.
  22. Miyamoto H., Chang M.C.: Development of mouse eggs fertilized *in vitro* by epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 30, 135—137, 1972.



23. Morcan L.: Intensive cattle breeding with ova transplantation. *New Zeal. J. Agricult.* 125, 6, 15—17, 1972.
24. Newcomb R., Rowson L.E.S.: Conception rate after uterine transfer of cow eggs, in relation to synchronization of oestrus and age of eggs. *J. Reprod. Fert.* 43, 3, 539—541, 1975.
25. Oguri N., Tsutsumi Y.: Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horses. *J. Reprod. Fert.* 31, 2, 187—195, 1972.
26. Oguri N., Tsutsumi Y.: Non-surgical egg transfer in mares. *J. Reprod. Fert.* 41, 2, 313—320, 1974.
27. Onuma H.: Repeated superovulation in calves. *J. anim. Sc.* 28, 5, 634—637, 1969.
28. Otel V., Fredaan T., Drume C.: Erste Erfahrungen mit der Eitransplantation bei Schweinen und Schafen in Rumanien. *Tierzüchter* 22, 19, 608—610, 1970.
29. Rowson L.E.A., Moor R.M., Lawson R.A.S.: Fertility following egg transfer in the cow; effect of method, medium and synchronization of oestrus. *J. Reprod. Fert.* 18, 3, 517—523, 1969.
30. Rowson L.E.A., Lawson R.A.S., Moor R.M.: Production of twins in cattle by egg transfer. *J. Reprod. Fert.* 25, 2, 261—268, 1971.
31. Rowson L.E.A.: Cattle twins from egg transplants. *New Zeal. J. Agricult.* 124, 1, 20, 1972.
32. Rowson L.E.A., Lawson R.A.S., Moor R.M., Baker A.A.: Egg transfer in the cow: synchronization requirements. *J. Reprod. Fert.* 28, 3, 427—431, 1972.
33. Rowson L.E.A.: Eitransplantation — Alternative für die Rinderzucht. *Tierzucht* 25, 10, 418—420, 1973.
34. Runner M.N., Palm J.: Transplantation and survival of unfertilized ova of mouse in relation to post-ovulatory age. *J. exper. Zool.* 124, 303—316, 1953.
35. Sherman J.K., Ten Pen Lin: Survival of unfertilized mouse eggs during freezing and thawing. *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.* 98, 902—905, 1958.
36. Sijaêcki N.: Otkrivanje ovocita svinja *in vivo*. *Godisnji Izv.* 1967, Novi Sad 1968, 27—29, 1967.
37. Sloan M.H., Coley S.L., Johnson A.D.: The influence of a cannula in the rabbit oviduct. II. Effect on embryo survival. *J. Reprod. Fert.* 37, 1, 155—158, 1974.
38. Smidt D.: Eitransplantation und Zyklussynchronisation beim Rind-Forschungsaufgaben und Aendungsmöglichkeiten. *Züchtungskunde* 45, 5, 318—324, 1973.
39. Smidt D.: Möglichkeiten der Erzeugung von Zwillingskälbern mit Hilfe der Eitransplantation. *Tierzüchter* 26, 8, 334, 1974.
40. Sreenan J., Scanlon P., Gordo I.: Storage of fertilized cattle ova *in vitro*. *J. agricult. Sc. (Cambridge)* 74, 3, 593—594, 1970.
41. Sreenan J.: Research is well advanced to produce a practical method of twinning in cattle. *Fm. Food Res.* 3, 6, 141—142, 1972.
42. Sreenan J.M., Beehan D.: Egg transfer in the cow: pregnancy rate and egg survival. *J. Reprod. Fert.* 41, 2, 497—499, 1974.
43. Sreenan J., Beehan D., Mac Donagh T.: Egg transfer techniques in cattle breeding. *Fm. Food Res.* 5, 3, 63—65, 1974.

44. Sugie T.: Successful transfer of a fertilized bivariate egg by non-surgical techniques. *J. Reprod. Fert.* 10, 197—201, 1965.
45. Tervit H.R., Mc Donald M.F.: Culture and transplantation of sheep ova. *New Zeal. J. Agric. Res.* 12, 2, 313—320, 1969.
46. Testart J.: Comparaison de différentes techniques de transplantation des blastocystes chez la lapine. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 9, 3, 351—360, 1969.
47. Testart J.: L'inovulation. Des jumeaux ... qui ne sont pas frères. *Elevage* 9, 73—77, 1972.
48. Wintemberger—Torrés S.: Influence de la taille des blastocystes et de leur consommation d'oxygène sur leur développement après transplantation chez la lapine. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.* 13, 1, 17—24, 1973.
49. Włodarska—Czarnocka A.: Metody przeszczepiania komórek jajowych i zastosowanie transplantacji w pracach genetycznych i hodowlanych. *Kosmos* 1, 17—25, 1973.
50. Wrathall A.E.: Egg transfer in pigs. *Agriculture (London)* 78, 4, 141—143, 1971.