

Biotechnologia w rozrodzie koni*

Marian Tischner

z Akademii Rolniczej w Krakowie

Sztuczne unasiennianie

Pierwsze wzmianki o unasiennianiu koni zawiera arabski tekst z 1322 r. Historia, apokryficzna lub nie, mówi, że szejek arabski w Darfurze zakradł się do namiotu skłó-

conego z nim sąsiada i pobrał nasienie od słynnego z urody i wytrzymałości ogiera, a następnie wprowadził je do dróg rodnych klaczy, która urodziła mu zdrowe źrebię (1). Pod koniec XIX wieku sztuczne unasiennianie koni zaczęto wprowadzać w wielu kra-

jach. W 1885 r. francuski lekarz weterynarii, Rëpiquet przedstawił własne wyniki unasienniania klaczy i możliwości zootechnicznego wykorzystania tej metody. Szczególnie zainteresowanie zastosowaniem sztucznego unasienniania u koni wykazali farmerzy amerykańscy, widząc w nim metodę zwalczania niepłodności. W 1893 r. czasopismo „The Horseman” opublikowało pozytywne wyniki lekarza weterynarii, profesora Pearsona z Uniwersytetu Pensylwanii.

Na Ukrainie w latach 1894–1898 polski lekarz weterynarii Ferdynand Chełchowski stosował tę metodę zarówno celem zwalczania choroby stadniczej koni, jak i ze wzglę-

* Referat wygłoszony 13 X 2005 r. w Krakowie podczas 17. spotkania lekarzy weterynarii Unii Europejskiej zajmujących się inseminacją.

Biotechnology in horse reproduction

Tischner M. • Agricultural University, Kraków.

In this article modern breeding technology in horses was presented. Artificial insemination (AI) is practiced extensively in many species. Despite the fact that it was first applied in mare this breeding technology was seldom in use in horses. Currently, new methods of semen collection and preservation have been developed. Veterinarians use now routinely the ultrasound examination of mare ovaries and uterus, which enables to utilize AI in about 40 countries. Assisted fertilization has developed. Methods of equine embryo transfer and preservation have greatly improved. There are several pairs of homozygotic twins born due to the embryos splitting. The mechanisms controlling pregnancy have been determined and between-species embryo transfer resulted in healthy offspring. Cloning with encouraging success has been recently the greatest achievement.

Keywords: horse, artificial insemination, embryo transfer, embryo preservation, assisted fertilization, cloning.

dów zootechnicznych. Opisał on metody sztucznego unasieniania, skonstruował instrumenty służące do zbierania i wstrzykiwania nasienia. Sztuczne unasienianie koni w Niemczech stosował Hoffman (1895 r.), w Rosji Lideman (1895 r.) oraz Izmailow i Jeniszerłow (1986 r.), na Węgrzech Kaldrowics i w Danii Sand i Stribolt (1902 r.; 2).

Przełomowe znaczenie dla wykorzystania sztucznego unasieniania w praktyce hodowlanej mają prace rosyjskiego biologa I. I. Iwanowa, który zorganizował pierwszą stację sztucznego unasieniania klaczy w 1903 r. Przez wiele lat doświadczenia zdobyte na koniach służyły hodowcom jako model w rozwoju sztucznego unasieniania innych gatunków zwierząt.

W latach międzywojennych sztuczne unasienianie klaczy stosowano na szeroką skalę w Związku Radzieckim, osiągając w latach 1939–1940 około 300 000 klaczy rocznie. Metody opracowane w latach trzydziestych, a usprawnione po II wojnie światowej wykazały, że sztuczne unasienianie daje możliwość uzyskiwania zażrebień dochodzącą nawet do 80%. Jednak przez wiele lat inseminacja koni nie była w pełni akceptowana przez wiele związków skupiających hodowców koni rasowych. Obawiano się, że powszechne stosowanie inseminacji może doprowadzić do ograniczenia różnorodności genetycznej. Często wyrażano obawy o ewentualne pomyłki porcji nasienia i utratę tą drogą czystości ras. Obecnie wiele związków hodowlanych na świecie zezwala na inseminację klaczy, a wyjątek stanowią towarzystwa hodowców koni pełnej krwi an-



Ryc. 1. Różne typy sztucznych pochew dla ogierów. Zbiór Katedry Rozrodu Zwierząt AR w Krakowie

gielskiej (The Jockey Club), amerykańskiego towarzystwa koni miniaturowych (American Miniature Horse Association) i kuców walijskich (Welsh Pony Society of America). Również w hodowli koni ras zachowawczych nie dopuszcza się inseminacji klaczy.

Aktualnie inseminacja koni stosowana jest w około 40 krajach świata. Procent klaczy objętych inseminacją waha się od 0,1 do 97, a ogólna liczba klaczy unasienianych rocznie przekracza milion. Najwięcej klaczy unasienianych jest w Chinach, USA, Finlandii, Francji, Holandii, Belgii i Niemczech.

Rozwój techniki pobierania nasienia od ogierów

Podczas początkowych prób stosowania sztucznego unasieniania nasienie zbierano za pomocą strzykawki z pochwy tuż po pokryciu grzejącej się klaczy lub wyciśnięciu nasienia z gąbki wkładanej do pochwy krytej klaczy. Pierwszą sztuczną pochwą dla ogierów w 1930 r. skonstruował Salzman w Laboratorium Sztucznego Unasieniania Zwierząt w Moskwie (3). Od tego czasu sztuczna pochwa dla ogierów była wielokrotnie modyfikowana i ulepszana (ryc. 1).

Dotychczas opisane modele sztucznej pochwy dla ogierów można podzielić na dwa typy konstrukcyjne: sztuczną pochwę zamkniętą, ze sztywnym (modele: Cambridge, Kolorado, francuski, bułgarski, Roanoke i inne) lub elastycznym (model Missouri) cylindrem zewnętrznym oraz sztuczną pochwą otwartą – model Kraków-72 (ryc. 2).

Mechanizm kopulacji i ejakulacji – frakcjonowane pobieranie nasienia

Badania nad mechanizmem kopulacji i ejakulacji u ogierów (4) wykazały, że wyzwo-

lenie ejakulacji u ogierów następuje w wyniku bodźców ciśnieniowych i ciepłych wywieranych głównie na nasadę, nie jak powszechnie przypuszczano na żołądź prącia. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na opracowanie modelu sztucznej pochwy typu otwartego i zmodyfikowanie techniki pobierania nasienia od ogierów. Sztuczna pochwa typu otwartego różni się od modelu klasycznego tym, że nie posiada zbiornika na nasienie. Ejakulowane nasienie zbierane jest wprost do lejka połączonego ze zbiornikiem. Ten sposób pobierania nasienia pozwala na rozdzielenie ejakulatu na frakcje, a nawet na poszczególne wyrzuty. Pierwsze 3 wyrzuty zawierają około 80% plemników całego ejakulatu. Podczas rutynowego pobierania nasienia ejakulat rozdzielany jest zazwyczaj tylko na dwie frakcje: bogatą w plemniki zawierającą pierwsze 3–4 wyrzuty oraz frakcję śluzową. Pobieranie nasienia przy użyciu sztucznej pochwy typu otwartego posiada szereg zalet. Przede wszystkim pozwala na wizualizację i kontrolę procesu ejakulacji oraz otrzymanie nasienia całkowicie wolnego od wtórnych zanieczyszczeń bakteryjnych, a w przypadku urospermii lub uszkodzeń prącia – wolnego od domieszek moczu i krwi. Pierwsze 2–3 wyrzuty nasienia zawierające frakcję bogatą w plemniki mogą być zamrażane bez konieczności szkodliwego dla nasienia wirowania i oddzielania frakcji śluzowej (ryc. 3, 4, 5).

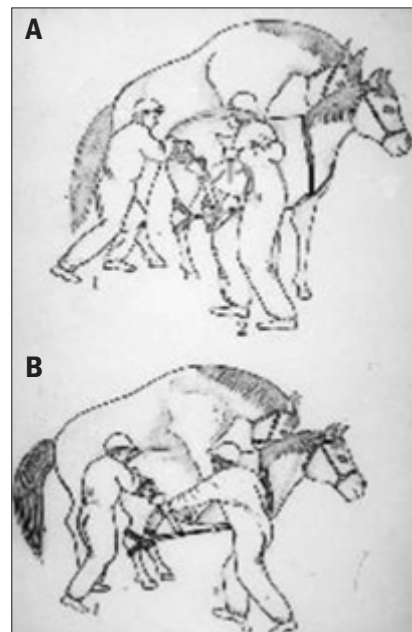
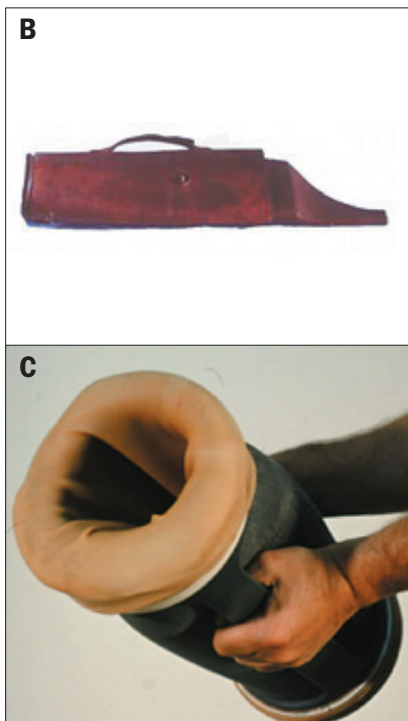
Fantomy

Użycie fantomu pozwala na sterylne pobranie nasienia. Jest również bezpieczniejsze zarówno dla osoby pobierającej nasienie, jak i dla ogiera.

Pierwszy fantom dla ogierów skonstruował prof. Tadeusz Olbrycht (ryc. 6) w 1935 r. na Akademii Medycyny Weterynaryjnej we Lwowie (5). Od tego czasu skonstruowano



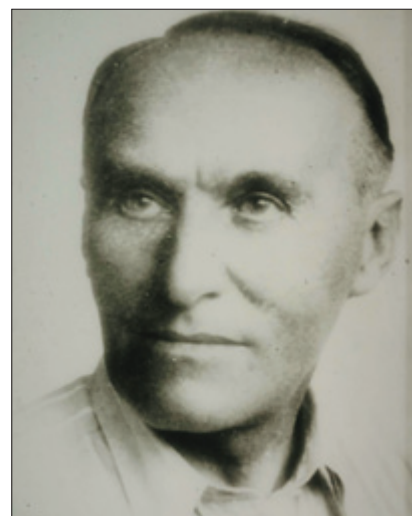
Ryc. 2. A – Klasyczny model sztucznej pochwy zamkniętej. B – Sztuczna pochwa zamknięta, z miękkim korpusem zewnętrznym (model Missouri). C – Sztuczna pochwa otwarta (model Kraków-72)



Ryc. 5. Podczas rutynowego pobierania nasienia za pomocą sztucznej pochwy otwartej ejakulat jest rozdzielany zazwyczaj na dwie frakcje. Frakcja bogata w plemniki zawierająca 3–4 pierwsze wyrzuty nasienia pobierana jest do zbiorniczka na nasienie połączonego z lejkiem trzymanym w prawej ręce (A), a pozostałe wyrzuty zawierające frakcje śluzową do drugiego zbiorniczka trzymanego w lewej ręce (B)



Ryc. 3. Sztuczna pochwa otwarta nie posiada zbiornika na nasienie. Podczas ejakulacji nasienie jest „łapane” bezpośrednio do lejka połączonego z probówką



Ryc. 6. Profesor Tadeusz Olbrycht (1891–1964)



Ryc. 4. Rozdzielenie ejakulatu na frakcje. Poszczególne wyrzuty są rozdzielane do probówek

wiele typów fantomów. Większość z nich przypomina naturalny kształt ciała klaczy. Najbardziej wymyślny fantom opracowano w Finlandii. Fantom ten posiada dostosowany do indywidualnych cech elektroniczny system regulacji wysokości, temperatury i ciśnienia wewnątrz pochwy. Pozwala również na automatyczny rozdział wyrzutów ejakulowanego nasienia (ryc. 7, 8).

Technika przechowywania nasienia

Po raz pierwszy schłodzone nasienie wykorzystali do inseminacji Walton i Prawocheński w 1936 r. Transportowali oni nasienie



Ryc. 7. Francuskie typy fantomów do pobierania nasienia od ogierów



Ryc. 8. Fiński typ fantomu – Equidame. Elektroniczna kontrola wysokości fantomu, temperatury i ciśnienia wewnątrz sztucznej pochwy. Możliwość automatycznego rozdzielenia ejakulatu na poszczególne wyrzuty

tryka rasy Suffolk z Anglii do Polski w termosie zawierającym kawałki lodu, w temperaturze 10°C. Tak przechowywanym nasieniem inseminowali 5 macierek, spośród których dwie urodziły jagnięta (6).

Przechowywanie schłodzonego nasienia ogierów

Aby przedłużyć czas życia plemników, stosowane są różnego rodzaju rozrzedzalniki zawierające w swym składzie substancje od-



Ryc. 9. „Equitainer” plastikowy termos do transportu schłodzonego nasienia



Ryc. 10. Prof. Władysław Bielański (1911–1982)



Ryc. 11. Klacz „Mrożonka” pierwszy koń urodzony w Polsce w 1969 r. w wyniku inseminacji nasieniem mrożonym

żywcze i ochronne. Do krótkotrwałego (do 8 godz.) przechowywania nasienia w temperaturze około 17°C często używany jest w Polsce rozrzedzalnik mlekowo-żółtkowy (7). Natomiast do przechowywania nasienia w temperaturze 4°C stosuje się coraz częściej rozrzedzalnik według Kenney'a i wsp. (8).

Zadawalające wyniki inseminacji nasieniem rozrzedzonym i schłodzonym uzyskuje się z reguły w przypadkach gdy początkowa ruchliwość nasienia jest wysoka, a zabieg inseminacji jest przeprowadzony do 24 godzin od chwili pobrania nasienia. Od ogierów o wysokiej płodności zadawalający procent zażrebień można uzyskać, gdy nasienie przechowywane jest w temp. 4°C przez 2–3 dni (ryc. 9).

Nasienie mrożone

Próby długotrwałej konserwacji nasienia ogierów podejmowano już w latach pięćdziesiątych, jednak wówczas tylko sporadycznie uzyskiwano zażrebień. Pierwsze dwa źrebięta urodzone po inseminacji pobranym nasieniem do sztucznej pochwy i zamrożonym w ciekłym azocie urodziły się w Japonii w 1964 r. (9).

W Polsce badania nad długotrwałą konserwacją nasienia zostały zapoczątkowane przez prof. Władysława Bielańskiego (ryc. 10) w połowie lat sześćdziesiątych. Pierwsze źrebię w wyniku inseminacji zamrożonym/rozmróznym nasieniem nazwane „Mrożonka” urodziło się w Krakowie w 1969 r. (10; ryc. 11).

Na początku lat siedemdziesiątych w niektórych stadninach koni w Polsce przeprowadzono udane próby inseminacji klaczy nasieniem mrożonym. W wyniku tych prób urodziło się kilka wartościowych koni. Przykładem właściwego indywidualnego doboru ogiera do klaczy i wykorzystania nasienia mrożonego było urodzenie się w 1971 r. w Stadninie Koni Pruchna klaczy półkrwi angloarabskiej „Arabella” po ogierze Cross XX. Klacz ta w sezonach wyścigów 1974–1976 wygrała wszystkie gonitwy, łącznie z derby dla koni półkrwi i pobiła rekord toru. Włączona do stada matek urodziła 16 źrebiąt (ryc. 12).

W wyniku udanych prób wykorzystania nasienia mrożonego nastąpiło duże zainteresowanie inseminacją, szczególnie wśród hodowców koni sportowych. Nasienie ogierów okazało się jednak bardziej



Ryc. 12. Klacz rasy anglo-arabskiej „Arabela” urodzona w 1971 w SK Pruchna w wyniku inseminacji nasieniem mrożonym. Wygrała wszystkie 6 gonitw w których biegała, pobiła rekord toru dla koni półkrwi. Włączona do stada urodziła 16 źrebiąt

wrażliwe na proces zamrażania-rozmrażania niż nasienie buhajów. Liczne badania wykazały, że nasienie około 25% ogierów znosi zadowalająco proces konserwacji w ciekłym azocie. Ruchliwość plemników w nasieniu tych ogierów po zamrożeniu/rozrożeniu waha się od 40–60%, a żrebność w jednym cyklu po inseminacji dawką zawierającą $>300 \times 10^6$ plemników wynosi od 40 do 50%. Nasienie około 50% ogierów znosi średnio proces konserwacji w ciekłym azocie, a nasienie pozostałych 25% ogierów nie nadaje się do inseminacji. Procent plemników ruchliwych w nasieniu po zamrożeniu/rozrożeniu u tych ogierów nie przekracza 10 (11, 12).

Pomimo licznych badań nad określeniem przyczyn obniżających płodność nasienia mrożonego ogierów trudno jednoznacznie określić czynniki wywierające wpływ na tzw. zamrażalność nasienia. Zła zamrażalność nasienia ogierów nie jest dodatnio skorelowana z ich płodnością. Po kryciu lub inseminacji schłodzonym nasieniem tych ogierów uzyskuje się zadowalające wyniki zażrebień.

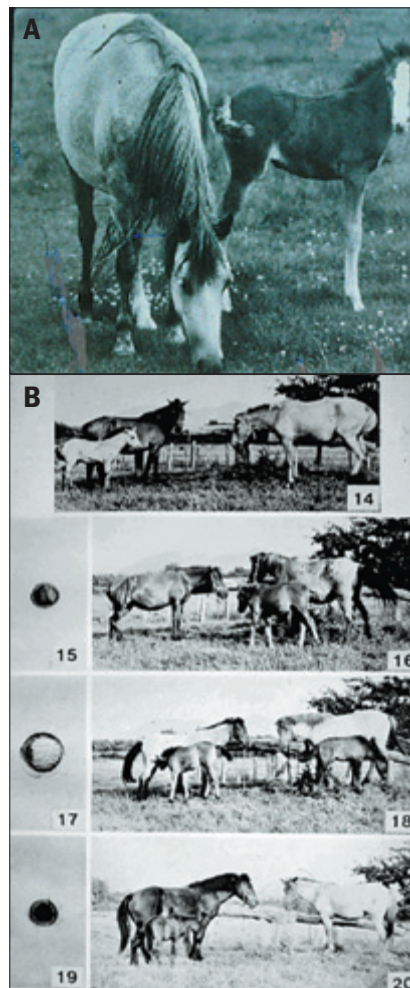
Uważa się, że proces mrożenia i rozmrażania znacznie ogranicza czas przeżywania plemników w drogach rodnych klaczy. Wyniki zażrebień klaczy inseminowanych nasieniem mrożonym można poprawić jedynie, stosując selekcję ogierów i ejakulatów na tzw. zmrażalność oraz przeprowadzając inseminację w okresie okołoowulacyjnym, tj. 12 h przed do 6 h po owulacji. W tym celu zalecane jest badanie klaczy podczas rui nie rzadziej niż co 6 godzin, a po stwierdzeniu owulacji natychmiastowe nasienianie (13). Niektórzy autorzy zalecają również głębokie deponowanie nasienia, w pobliżu ujścia jajowodu po stronie owulującego jajnika (14).

Transplantacja zarodków

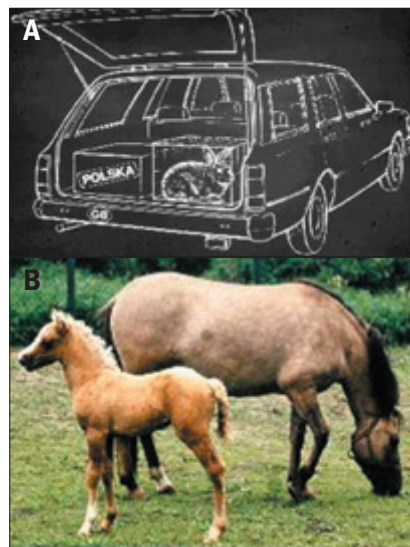
Transplantacja zarodków znacznie poszerza możliwości zwiększenia płodności i plenności koni. Pierwsze źrebięta po transplantacji zarodków urodziły się niemal równocześnie w Japonii i Anglii (15, 16; ryc. 13). W Polsce dwa pierwsze źrebięta urodziły się w 1976 r. w wyniku transplantacji metodą chirurgiczną i niechirurgiczną zarodków przywiezionych z Anglii samochodem w podwiązanych jajowodach żywych królic (17; ryc. 14). Następne dwa źrebięta urodziły się 6 lat później po transplantacji zarodków metodą niechirurgiczną (18).

Ze względu na stosunkowo łatwe i nieszkodliwe dla klaczy pozyskiwanie i transplantację zarodków metodę tę zaakceptowało już wiele związków hodowlanych. Transplantacja jest szeroko stosowana w Argentynie, gdzie pobiera się zarodki od wybitnych klaczy używanych do gry w polo, a także we Francji, gdzie z kolei dawczyniami zarodków są klacze sportowe (19, 20). Zarówno w Argentynie, jak i we Francji wykonuje się rocznie po około 400–600 zabiegów. Sporo zabiegów wykonuje się również w USA.

Szersze wykorzystanie techniki transplantacji zarodków u koni napotyka jednak wiele barier. Główną przeszkodą ograniczającą wykorzystanie tej metody w hodowli jest brak tak skutecznych, jak np. u bydła, metod wywoływania superowulacji. Inną barierę stanowi glikoproteinowa kapsuła specyficzna dla zarodków koni, która powstaje w warunkach *in vivo* około 6–7 dnia po zapłodnieniu po wewnętrznej stronie osłonki przejrystej. Uszkodzenie kapsuły podczas transportu, konserwacji, zabiegu transplantacji lub dzielenia zarodka ogranicza możliwości jego dalszego rozwoju *in vivo*.



Ryc. 13. Pierwsze źrebięta w wyniku transplantacji zarodków urodziły się niemal równocześnie w Wielkiej Brytanii (A) i w Japonii (B) w 1973 r.



Ryc. 14. W Polsce dwa pierwsze źrebięta urodziły się w 1976 r. w wyniku transplantacji zarodków przywiezionych samochodem z Anglii w podwiązanych jajowodach żywych królic (A). Klacz biorczyni rasy konik polski wraz ze źrebięciem „Sopelek” rasy Welsh Pony urodzonym w wyniku transplantacji importowanego zarodka z Anglii (B)



Ryc. 15. Niechirurgiczny sposób pozyskiwania zarodków od klaczy (Newmarket - Wielka Brytania)



Ryc. 16. Transplantacja zarodków poprzez laparotomię w słaźnię klaczy (Twink Allen - Newmarket)

Pozyskiwanie zarodków

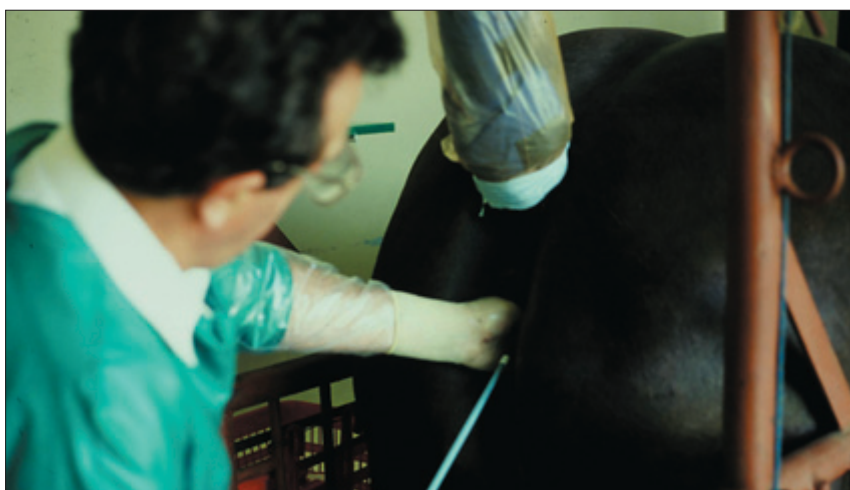
Niechirurgiczna metoda pozyskiwania zarodków polega na płukaniu macicy płynem wprowadzanym za pomocą jałowego cewnika zaopatrzonego, podobnie jak kateter Foley'a, w gumowy balonik. Celem uszczelnienia ujścia macicy napęlnia się gumowy balonik powietrzem. Zabieg pozyskiwania zarodków techniką niechirurgiczną stosowany jest najczęściej w 6-11 dniu po owulacji. Wyniki uzyskiwania zarodków od zdrowych klaczy w 7-10 dniu po owulacji wahają od 50 do 80%. Natomiast w 6 dniu po owulacji uzyskuje się znacznie mniej zarodków. Gorsze wyniki pozyskiwania zarodków w 6 dniu po owulacji powodowane są opóźnionym transportem zarodków przez jajowody u niektórych klaczy (21, 22; ryc. 15).

Metody transplantacji zarodków

Wybór metody transplantacji zarodków ma istotny wpływ na wyniki zażebień. Metody operacyjne (poprzez laparotomię w kresie białej lub w słaźnię), pomimo że są czasochłonne, kosztowne, a także ryzykowne dla klaczy biorczyń, pozwalają na uzyskanie regularnych zażebień w granicach 60-80% (ryc. 16, 17).



Ryc. 17. Przygotowanie klaczy do chirurgicznej transplantacji zarodków w kresie białej (Kraków - 1990)



Ryc. 18. Niechirurgiczna transplantacja zarodków przez szyjkę macicy

Metoda niechirurgiczna jest łatwa do opanowania ze względu na charakterystyczną budowę szyjki macicy (ryc. 18). Jednak wyniki transplantacji zarodków tą metodą przez wiele lat były nierówne i wahały się od 20 do 60%. Główną przyczyną niższego procentu zażebień jest uwalnianie prostaglandyny i oksytocyny na skutek manipulacji w szyjce macicy i spowodowanie luteolizy (5-7 dzień po owulacji), a także wywoływanie miejscowego stanu zapalnego błony śluzowej poprzez wprowadzenie drobnoustrojów do macicy w okresie obniżonej odporności śródmacicznej. Niemniej Pashen i wsp. (20) w Argentynie, Meadows i wsp. (23) w Irlandii i Jaśko i wsp. (24) w USA, stosując niechirurgiczną metodę transplantacji zarodków uzyskiwali żebność od 75 do 85%.

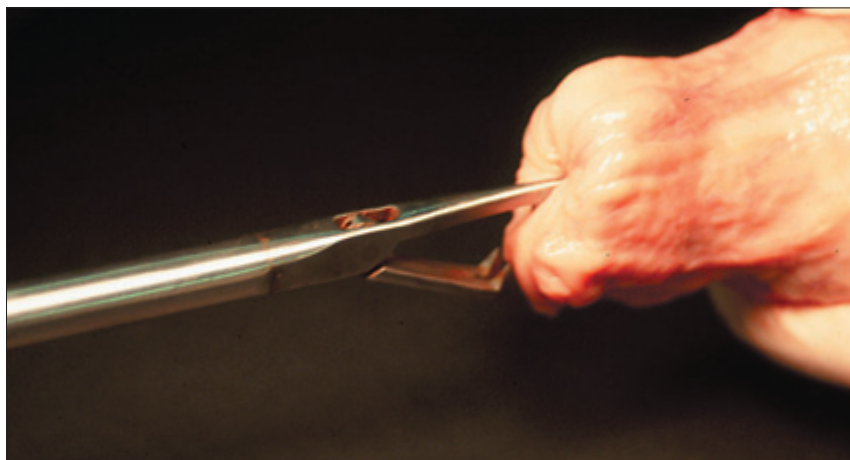
Ostatnio Wilsher i Allen (25) opracowali nowy sposób niechirurgicznej transplantacji zarodków. Metoda ta polega na wprowadzeniu do pochwy wziernika Połańskiego, rozwarciu jego ramion i uwidocznieniu zewnętrznego ujścia szyjki macicy. Następnie za pomocą zmodyfikowanych kleszczy podciąga się delikatnie szyjkę macicy w kierunku ujścia pochwy. Zaro-

dek umieszczony w słonce o pojemności 2,0-3,0 ml i w pistolecie typu Casou jest deponowany w macicy. Ta prosta i szybka metoda pozwala na uzyskanie żeźrebień powyżej 90% (ryc. 19, 20).

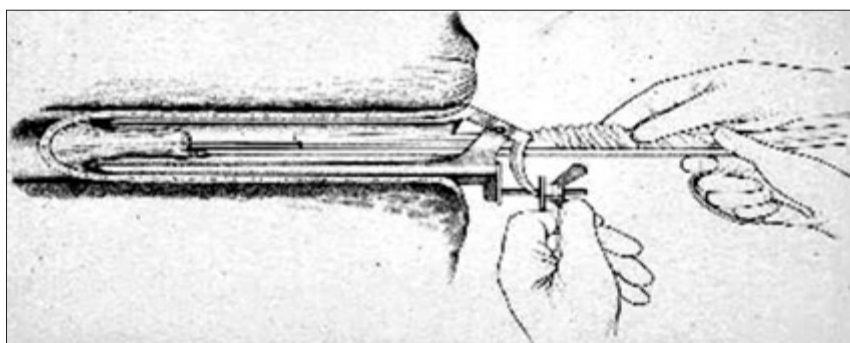
Konserwacja zarodków w ciekłym azocie

Konserwacja zarodków koni w ciekłym azocie napotyka wiele trudności. Zarodki koni lepiej znoszą proces zamrażania-rozmrażania przed całkowitym wytworzeniem kapsuły, gdy są w stadium moruli lub wczesnej blastocysty i kiedy ich średnica nie przekracza 300 μm . Barię, która utrudnia przechodzenie krioprotektorów do wnętrza zarodka jest kapsuła (26).

Pierwsze źrebięta po mrożonych/rozrożonych zarodkach urodziły się w Japonii (27), a następne w Anglii (ryc. 21) i USA w 1984 i 1985 r. (28, 29). W 1985 r. urodziło się również źrebię w Anglii w wyniku transplantacji metodą chirurgiczną zarodka mrożonego w Polsce (ryc. 22), a w 2005 r. otrzymano źrebię w Krakowie w wyniku niechirurgicznej transplantacji zarodka mrożonego w Newmarket (ryc. 23).



Ryc. 19. Niechirurgiczny sposób transplantacji zarodków wg Wilshera i Allena (47). Podciąganie szyjki macicy w kierunku ujścia pochwy kleszczami Wilshera



Ryc. 20. Zdeponowanie zarodka w macicy. Plastikowa koszulka wokół pistoletu transplantacyjnego zabezpiecza przed przeniesieniem zanieczyszczeń do macicy (Wilsher & Allen 2004)

Na wyniki zażrebień klaczy istotny wpływ wywiera również metoda mrożenia zarodków. Po transplantacji mrożonych zarodków klasyczną dwustopniową techniką uzyskuje się z reguły wyniki poniżej 20% zażrebień. Eldridge-Panuska i wsp. (30) zastosowali technikę mrożenia zarodków poprzez wtryskiwanie, uzyskując wyniki zażrebień porównywalne do wyników, jakie uzyskuje się po transplantacji świeżych zarodków. Dużą zaletą tej metody jest możliwość przeprowadzenia transplantacji w warunkach terenowych, bez konieczności dodatkowych manipulacji związanych z usunięciem krioprotektorów i przemywaniem zarodków.

Wpływ matczyny na wielkość koni urodzonych po transplantacji zarodków

W połowie lat osiemdziesiątych przeprowadzono w Krakowie eksperyment międzyrasowej transplantacji zarodków, którego celem było określenie wpływu klaczy biorczyń na rozwój źrebiąt i ostateczną wielkość koni (18). Zarodki pobierano od małych klaczy rasy konik polski, o średniej masie ciała 380 kg i transplantowano do dużych klaczy typu zimnokrwistego o masie ciała ok. 710 kg (ryc. 24). Po stwierdzeniu ciąży u klaczy biorczyń, dawczyni zarodków ponownie zażrebiano tym samym ogierem. Ogółem uzyskano w ten sposób 6 par źrebiąt peł-

nego rodzeństwa rasy konik polski. Jednak ze względu na różnice tempa wzrostu uwarunkowane płcią koni do badań porównawczych wybrano tylko dwie pary siostr i jedną parę braci. Podobny eksperyment międzyrasowej transplantacji zarodków pomiędzy koniami pełnej krwi angielskiej i pony przeprowadził Allen i wsp. (31).

Badania porównawcze wykazały, że matczyny wpływ klaczy jest największy w okresie płodowym. Istnieje niemal liniowa zależność pomiędzy masą płodu a powierzchnią łożyska, co oznacza, że im większa jest powierzchnia łożyska, tym większa będzie masa płodu i noworodka. Nieco mniejsza zależność występuje pomiędzy masą ciała matki a masą płodu, niemniej jednak i w tym przypadku zaznacza się tendencja, że im cięższa i większa będzie klacz, tym większe będzie urodzone przez nią źrebię. W okresie oseskowym wyraźnie zaznaczają się dziedziczne uwarunkowania intensywności wzrostu źrebiąt. Szybciej rosną te źrebięta, które urodziły się małe, a zwiększone żywienie źrebiąt w tym okresie powiększa przyrosty masy ciała, natomiast nie przyspiesza tempa ich wzrostu. W wieku dojrzwania, po odłączeniu źrebiąt od matek, następuje dalsza rekompensata rozwoju uwarunkowana cechami genetycznymi koni. Jednak pomimo intensywniejszego wzrostu źrebiąt, które



Ryc. 21. Źrebię „Mrozik” urodzone w Cambridge w 1983 r. w wyniku transplantacji mrożonego zarodka wraz z klaczą biorczynią (15)



Ryc. 22. Ogierek „Winston” rasy konik polski urodzony w 1985 r. w Cambridge w wyniku chirurgicznej transplantacji mrożonego zarodka w Polsce i przywiezionego do Anglii drogą lotniczą

urodziły się małe, nie były w stanie nadrobić strat rozwojowych z okresu płodowego. Zaś te konie, które miały dogodne warunki odżywiania i rozwoju w okresie płodowym, w wieku dojrzałym były wyższe (o około 2–5%) i miały dłuższe kości długie kończyn w porównaniu do koni kontrolnych urodzonych przez genetyczne matki. Największe różnice zaznaczyły się w długości kości, które kostnieją najwcześniej, tj. kości pięcynowych (ok. 9%) i śródreżca III (ok. 6%). Badania te wykazały, że niezależnie od genetycznych uwarunkowań istotny wpływ na ostateczny wzrost koni wywiera odżywianie płodu podczas ciąży oraz mleczność matki w okresie oseskowym źrebiąt (22, 31, 32).

Dzielenie zarodków

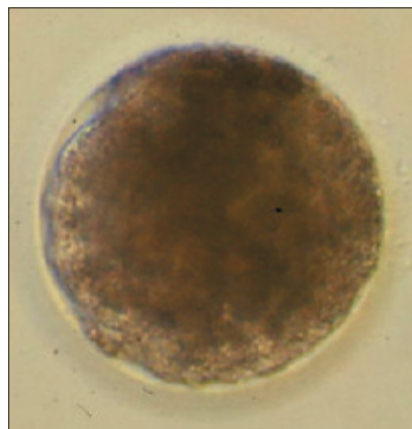
Urodzenie się bliźniąt u koni jest niepożądane. Niekiedy jednak spotyka się przypadki urodzenia i odchowania bliźniąt. Są to jednak bliźnięta różnojajowe. W hodowli koni nie napotkano dotychczas urodzenia się bliźniąt jednojajowych. Uzyskanie takich bliźniąt jest jednak możliwe. W tym



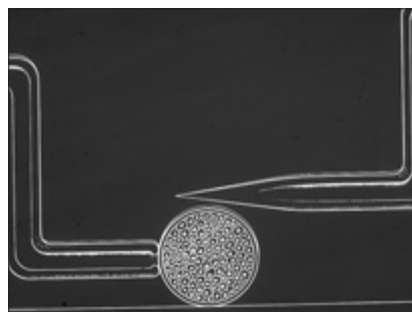
Ryc. 23. Klaczka „Mrożona Róża” urodzona w Krakowie w 2005 r. w wyniku niechirurgicznej transplantacji mrożonego zarodka w Newmarket wraz z klaczą biorczynią rasy konik polski



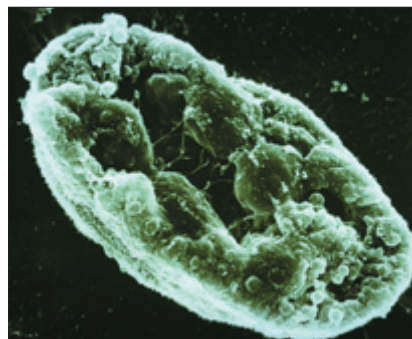
Ryc. 24. Międzyrasowa transplantacja zarodków. Klacz dawczyni zarodków rasy konik polski (nr 16) i klacz biorczyni typu zimnokrwistego (43)



Ryc. 25. Zarodek konia w stadium wczesnej blastocysty. Strzałką zaznaczono kapsułę zarodka



Ryc. 26. Dzielenie zarodka



Ryc. 27. Połówka zarodka kilka godzin po przepołowieniu

celu należy podzielić zarodek, a uzyskane połówki zarodka transplantować do klaczy biorczyni (ryc. 25, 26, 27). W wyniku licznych eksperymentów uzyskano dotychczas 5 par źrebiąt bliźniąt monozygotycznych, spośród których 4 urodziły się w Anglii (33, 34; ryc. 28) i jedna para w USA (35).

Międzygatunkowa transplantacja zarodków

Głównym celem eksperymentów międzygatunkowej transplantacji zarodków u koniowatych jest poznanie mechanizmów regulujących wczesny rozwój ciąży i szukanie na tej drodze niezakaźnych przyczyn ronięcia, a także ratowanie ginących egzotycznych ras i wymierających gatunków koniowatych. Pomimo różnic fenotypowych i genotypowych, uzyskano potomstwo po



Ryc. 28. Trzy pary identycznych bliźniąt uzyskanych w wyniku podzielenia zarodków i transplantacji ich połówek do różnych klaczy biorczyń. Newmarket (1, 36)



Ryc. 29. Klacze mulice – biorczynie zarodków wraz ze źrebięciem konia i źrebięciem osła uzyskanych w wyniku transplantacji zarodków (16)

transplantacji zarodka:

- konia Przewalskiego (*E. przewalski*, $2n=66$) do klaczy konia (*E. caballaus*, $2n=64$);
- konia (*E. caballaus*, $2n=64$) do klaczy oślicy (*E. asinus*, $2n=62$);
- zebry (*E. burchelli*, $2n=44$) do klaczy oślicy (*E. asinus*, $2n=62$);
- zebry (*E. burchelli*, $2n=44$) do klaczy konia (*E. caballaus*, $2n=64$);
- konia (*E. caballaus*, $2n=64$) do klaczy mulicy (*E. mulus mulus*, $2n=63$), oraz
- zarodków osła (*E. asinus*, $2n=62$) do klaczy mulicy (*E. mulus mulus*, $2n=63$).

Jedną z cięż, która różni się zasadniczo od innych, jest cięża uzyskana po transplantacji zarodka:

- osła (*E. asinus*, $2n=62$) do klaczy - konia (*E. caballaus*, $2n=64$). W tym przypadku w 80% rozwijająca się początkowo cięża zostaje poroniona w 80-95 dniu (23, 36, 37; ryc. 29, 30; tab. 1).

Zapłodnienie *in vitro*

Badania nad zapłodnieniem *in vitro* u koni są prowadzone w wielu ośrodkach przez wiele lat. Jednak dotychczas uzyskano jedynie jedno źrebię urodzone we Francji po zapłodnieniu *in vitro* oocytu dojrzewającego *in vivo* (38; ryc. 31). Oocyt aspirowano z przedowulacyjnego pęcherzyka jajnikowego pod kontrolą ultrasonografu, metodą OPU (ovum pick-up). Przypuszcza się, że główne problemy zapłodnienia *in vitro* u koni to zaburzenia dojrzewania oocytów w warunkach pozaustrojowych, niewłaściwa kapacytacja plemników w warunkach *in vitro* oraz stwardnienie osłonki przejrzystej utrudniającej wnikanie plemników w głąb cytoplazmy.

Zapłodnienie wspomagane u koni

Próby zapłodnienia pozaustrojowego oocytów dojrzewających w warunkach pozaustrojowych nie przynoszą oczekiwanych rezultatów, rozpoczęto zatem wprowadzać techniki zapłodnienia wspomaganego (ryc. 32). Squires i wsp. w 1996 r. po raz pierwszy uzyskali potomstwo po mikroiniekcji plemników do cytoplazmy oocytów dojrzewających w warunkach *in vitro*. Ostatnio szereg autorów donosi o urodzeniu żywych źrebiąt w wyniku wspomaganego zapłodnienia (39, 40, 41, 42).

Metody wspomaganego zapłodnienia polegają na ułatwieniu pokonania lub wyeliminowaniu bariery, jaką stanowi dla plemników osłonka przejrzysta. Niektóre z nich pozwalają na bezpośrednie wprowadzenie wyselekcjonowanego plemnika do wnętrza cytoplazmy komórki jajowej (intracytoplasmic sperm injection-ICSI) lub pod osłonkę przejrzystą do przestrzeni podotoczkowej (subzonal sperm injec-

Tabela 1. Rozwój i czas życia kubków macicznych biorczyń zarodków oraz wyniki międzygatunkowej transplantacji zarodków u koniowatych (36).

Genotyp zarodka/płodu	Genotyp klaczy/biorczyni	Kariotyp zarodka: biorczyni (2n=liczba chromosomów)	Rozwój i czas życia kubków macicznych	Wynik
koń Przewalskiego	koń	66:64	++ >60 dni	poród
koń	osioł	64:62	++++ >60 dni	poród
koń	muł	64:63	+++ >60 dni	poród
osioł	muł	62:63	+ >60 dn	poród
zebra	osioł	46:62	+ 15–30 dni	poród
zebra	koń	46:64	± <10 dni	poród
osioł	koń	62:64	–	80% ronienie

tion-SZSI), ułatwiając dodatkowo proces fuzji obu gamet. Warunkiem powodzenia zabiegu mikroiniekcji plemnika do oocytu jest odpowiedni sprzęt, tj. mikroskop wyposażony w mikromanipulator i mikronarzędzia oraz indywidualne predyspozycje osób obsługujących te urządzenia.

Do zapłodnienia wspomaganego nadają się tylko te oocyty, które hodowane *in vitro* dojrzejwią do stadium metafazy II, czyli do stadium, w którym uwalniane są z pęcherzyka podczas spontanicznej owulacji. Każdy rodzaj plemników może zostać użyty do ICSI (główki, nieruchome, martwe, morfologicznie zmienione plemniki). Kapacytacja i reakcja akrosomalna plemników nie są konieczne. Do mikroiniekcji można stosować nasienie świeże lub mrożone. Plemnik unieruchomiony poprzez nacisk końcem mikropipety na witkę i po przełamaniu jej w połowie długości zostaje zaaspirowany do mikropipety od strony witki i wprowadzony do oocytu (ryc. 33). Bezpośrednio po mikroiniekcji oocyty są hodowane w warunkach *in vitro* lub przenoszone na 4–5 dni do podwiązanych jajowodów biorczyń pośrednich, a następnie w stadium moruli lub wczesnej balastocysty transplantowane do ostatecznych biorczyń.

Klonowanie koni

Możliwość klonowania ssaków poprzez przeniesienie jądrowych komórek somatycznych uznane zostało za kamień milowy w rozwoju nauk biologicznych. Wilmut i wsp. (43) po raz pierwszy wykazali, że całkowicie zróżnicowana komórka somatyczna może powrócić do niezróżnicowanego stanu jednokomórkowej zygoty (czyli zarodka) i rozpocząć proces rozwoju prowadzący do narodzenia zwierzęcia genetycznie identycznego z oryginalną komórką dawcy. Jedną komórką nazywaną dawcą jądrowym lub karioplastem pochodzi od zwierzęcia, które ma być klonowane. Drugą komórką nazywaną cytoplastem jest dojrzały oocyt, z którego usunięto materiał genetyczny: ciał-



Ryc. 30. Wyniki międzygatunkowej transplantacji zarodków. Klacze biorczynie zarodków ze źrebciem osła, zebry i konia Przewalskiego. Cambridge (2)



Ryc. 31. Pierwsze źrebę urodzone w wyniku zapłodnienia *in vitro* we Francji (31)

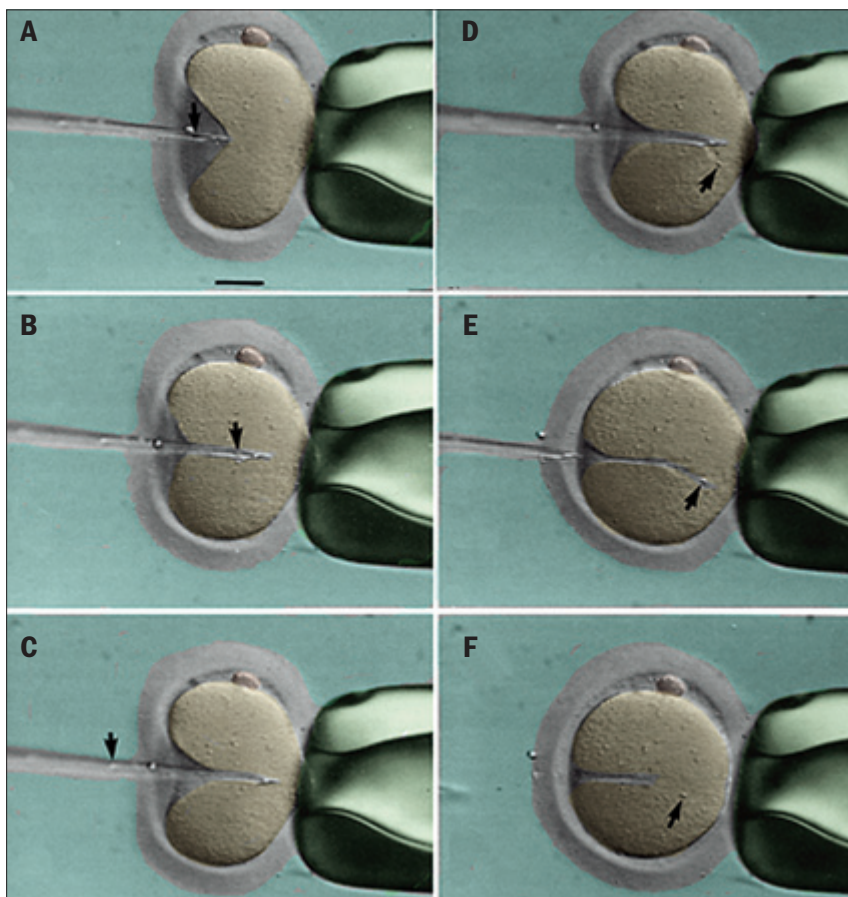
ko kierunkowe i płytkę metafazalną. Cytoplast zawiera liczne czynniki komórkowe (np. RNA i białka), które odgrywają ważną rolę w przeprogramowaniu materiału genetycznego (genów) komórki somatycznej. Zrekonstruowany zarodek wykorzystuje DNA komórki dawcy jako szablonu dla ekspresji genowej, jest transplantowa-

ny do biorczyni ostatecznej, która wydaje na świat klon zwierzęcia dawcy komórki somatycznej (ryc. 34).

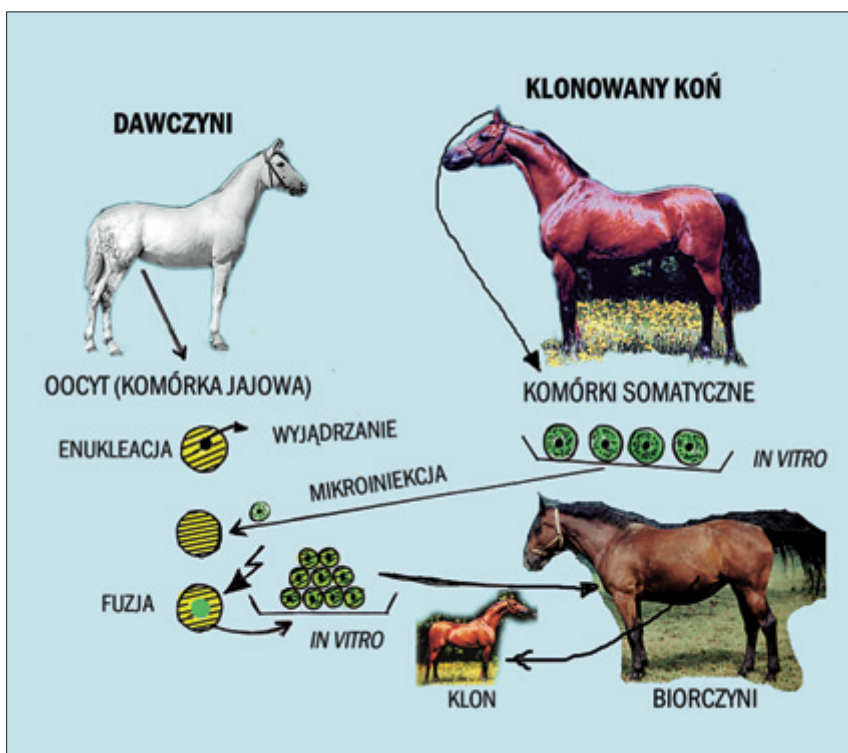
W wyniku somatycznego klonowania uzyskano dotychczas klony owiec, myszy, bydła, kóz, królików i świń. Pierwsze 3 muły klony urodziły się w USA w 2003 r. Komórki do klonowania pobra-



Ryc. 32. Przyżyciowy sposób pozyskiwania oocytów od klaczy. A – Premedykacja klaczy. B – Nakłucie dojrzalego pęcherzyka jajnikowego pod kontrolą USG. C – Aspiracja płynu pęcherzykowego. (Fort Collins, Colorado, 1986). D – Oocyt i plemniki – próba zapłodnienia *in vitro*



Ryc. 33. Zapłodnienie wspomagane. Mikroiinjekcja plemnika do cytoplazmy oocyta. Strzałką zaznaczono plemnik. A – Oocyt podtrzymywany przez pipetę zasysającą. Ciało kierunkowe na godz. 12. Mikropipeta wraz z plemnikiem przebija osłonkę przejrzystą. B – Mikropipeta wnika w głąb cytoplazmy. C – Przebicie oolemy. Cytoplazma wnika do mikropipety, a plemnik cofa się w głąb mikropipety. D – Cytoplazma wraz z plemnikiem zostają umieszczone w oocycie. E – Wycofanie mikropipety z oocyta. F – Oolemma i cytoplazma wracają do pierwotnego kształtu



Ryc. 34. Schemat klonowania koni

no z 45-dniowego płodu, a zrekonstruowane zarodki transplantowano do klaczy konia, które urodziły zdrowe i normalnie rozwinięte muły (44, 45).

Pierwszym klonem konia była klaczka rasy haflinger o imieniu „Prometea”, którą urodziła dawczyni karioplastu (komórki somatycznej) w 2003 r. w Cremonie we Włoszech (46). Aby „stworzyć” „Prometeę”, dr C. Galii hodował fibroblasty skóry klaczy rasy haflinger, które następnie wprowadził do oocytu pozbawionego jądra komórkowego. Spośród ponad 300 uzyskanych w ten sposób zarodków, jedynie 14 rozwinęło się podczas 7-dniowej hodowli do stadium moruli/blastocysty. Dwa z nich transplantowano do tej samej klaczy, od której pobrano komórki somatyczne. Pozostałe zarodki transplantowano do innych klaczy biorczyń. Jedynym zarodkiem, z którego rozwinęła się normalnie donoszona cięża była „Prometea” (ryc. 35).

Sukcesem zakończyła się również próba klonowania wałacha „Pieraz” jednego z trzydziestu tzw. koni wszechczasów, wielokrotnego zwycięzcy najtrudniejszych rajdów długodystansowych, którego ojcem był polski ogier janowskiej hodowli „Pierścień” z linii Kuhailan (ryc. 36). „Pieraz” został wykastrowany w wieku ok. 2 lat. Jego komórki somatyczne pobrane w 2002 r. zdeponowano w banku komórek firmy Cryozootech we Francji. Doktor C. Galii z Instytutu im. Lazzaro Spallanzanego w Cremonie we Włoszech wspólnie z dr E. Palmerem reprezentującym francuską firmę Cryozootech dokonali sklonowania „Pieraza”. Spośród 226 klonowanych komórek uzyskano 34 zarodki, które transplantowano do 12 klaczy biorczyń uzyskując 3 cięża, z których jedna zakończyła się urodzeniem 26 lutego 2005 r. ogierka „Pieraz 2”, w Cremonie, we Włoszech (47; ryc. 37).

Piśmiennictwo

- Perry E. J.: Historical. W: Perry E. J. (edit.): *The Artificial Insemination of Farm Animals*. Rutgers University Press, New Brunswick 1945, s. 308.
- Bielanski W.: *Zoohigiena i weterynaria dla zootechników. II. Rozród wraz ze sztucznym unasiennianiem zwierząt gospodarskich*. PWN, Warszawa 1969.
- Milowanow V. K.: *The artificial insemination of farm animals*. Selhhoziz, Moscow 1938.
- Tischner M., Kosiniak K., Bielański W.: Analysis of the pattern of ejaculation in stallion. *J. Reprod. Fert.* 1974, **41**, 329–335.
- Olbrycht T.: Sztuczne unasiennianie klaczy. *Przegląd Wet.* 1935, **12**, 1–28.
- Prawocheński R., Walton A.: Sztuczna inseminacja owiec na odległość. *Pamiętnik Państwowego Instytutu Naukowego Gospodarstwa Wiejskiego w Puławach*. 1936, **16**, 265–276.
- Chmielarski A., Nowakowski W.: *Unasiennianie klaczy*. PWRiL, Warszawa 1967.
- Kenney R. M., Bergman R. V., Cooper W. L., Morse G. W.: Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. *Proc. 21st Am. Assoc. Equine Pract.* 1978, 327–335.
- Nagase H., Soejima A., Nowa T., Oshida H., Sagara Y., Ishizaki N., Hoshi S.: Studies on the freezing storage of stallion semen fertility results of semen in concentrated pellet form. *J. Jap. Anim. Reprod.* 1966, **12**, 48–52.
- Baczyński J., Bielański W., Bilik K., Draus S., Zapletal Z.: Sztuczne unasiennianie koni. IV. Wstępne wyniki unasienniania klaczy nasieniem mrożonym. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 1971, **124**, 134–138.
- Boyle M. S.: Assessing the potential fertility of frozen stallion semen. W: Allen W. R., Wade J. F. (edit.): *Havemeyer Foundation Monograph. R&W Publications Ltd. Newmarket 2000, Series No. 1*, s. 13–16.
- Tischner M.: Evaluation of deep frozen semen in the stallion. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1979, **27**, 53–59.
- Samper J. C., Vidament M., Katila T., Newcombe J., Estrada A., Sargeant J.: Analysis of some factors associated with pregnancy rates of frozen semen: a multi-center study. W: Evans M. J. (edit.): *Equine Reproduction VIII. Theriogenology* 2002, **58**, 647–650.
- Morris L. H. A., Tiplady C., Allen W. R.: Pregnancy rates in mares after a single fixed time hysteroscopic insemination of low numbers of frozen-thawed spermatozoa into the uterotubal junction. *Equine Vet. J.* 2003, **25**, 197–201.
- Allen W. R., Rowson L. E. A.: Surgical and non-surgical egg transfer in horses. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 1975, **23**, 525–530.
- Oguri N. H.: Transplantation of fertilized ova in horses. *Jap. J. Anim. Reprod.* 1973, **19**, 1–14.
- Allen W. R., Stewart F., Trounson A. O., Tischner M., Bielański W.: Viability of horse embryos after storage and long-distance transport in the rabbit. *J. Reprod. Fert.* 1976, **47**, 387–390.
- Tischner M.: Przeszczepianie zarodków u koni. *Medycyna Wet.* 1982, **7**, 346–349.
- Clement F., Hofferer S., Vincent P.: La transplantation embryonnaire chez la jument. *Equ'Idée* 1995, **17**, 56–62.
- Pashen R.L., Lascombes F.A., Darrow M.D.: The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. *Equine Vet. J. Suppl.* 1993, **15**, 119–121.
- Battut L., Grandchamp des Raux A., Nicaise J. L., Fieni F., Tainturier D., Bruyas J.E.: When do equine embryos enter the uterine cavity? An attempt to answer. W: Katila T., Wade J.F. (edit.) *Havemeyer Foundation Monograph R & W Publications Ltd. Newmarket, 2000, Series No. 3*, s. 66–68.
- Tischner M.: Embryo recovery from Polish pony mares and preliminary observation on foal size after transfer of embryos to large mares. *Equine Vet. J.* 1985, Suppl. **3**, 96–98.
- Meadows S., Lisa H., Welsh C.: Factors affecting embryo recovery, embryo development and pregnancy rate in a commercial embryo transfer programme. In: Allen W. R. and Wade J. F. (edit.) *Havemeyer Foundation Monograph. R&W Publications Ltd. Newmarket, 1999, Series No. 1*, s. 61–66.
- Jasko D. J.: Comparison of pregnancy rates following non-surgical transfer of day 8 equine embryos using various transfer devices. W: Evans M. J. (edit.) *Equine Reproduction VIII. Theriogenology* 2002, **58**, 713–716.
- Wilsher S., Allen W. R.: An improved method for non-surgical embryo transfer in the mare. *Equine Vet. Educ.* 2004, **16**, 39–44.
- Allen W. R.: The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod. Dom. Anim.* 2005, **40**, 310–329.
- Yamamoto M., Oguri N. H., Tsutsumi Y., Hachinohe Y.: Experiments in the freezing and storage of equine embryo. *J. Reprod. Fert.* 1982, Suppl. **32**, 399–403.
- Członkowska M., Boyle M. S., Allen W. R.: Deep freezing of horse embryos. *J. Reprod. Fert.* 1985, **75**, 485–490.
- Slade N. P., Takeda T., Squires E. L., Elsdon R. P., Seidel G. E. Jr.: A new procedure for the cryopreservation of equine embryo. *Theriogenology* 1985, **24**, 45–58.
- Eldridge-Panuska W. D., Caracciolo di Brenza C., Seidel G. E. Jr., Squires E. L., Carnavale E. M.: Establishment of pregnancies after seal diluent or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology*, 2005, **63**, 1308–1319.
- Allen W. R., Wilsher S., Tiplady C., Butterfield R. M.: The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horses. III Postnatal growth. *Reproduction* 2004, **127**, 67–77.
- Tischner M.: Studies on the maternal influence on size of the horse born after embryo transfer. *Proc. 7th Int. Symp. Equine Reprod, South Africa*, 1998, s. 183–184.
- Allen W. R., Pashen R. N.: Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *J. Reprod. Fert.* 1984, **71**, 607–613.
- Skidmore J., Boyle M. S., Cran D., Allen W. R.: Micromanipulation of equine embryos to produce monozygotic twins. *Equine Vet. J.* 1989, Suppl. **8**, 126–128.
- Slade N. P., Williams T. J., Squires E. L., Seidel G. E. Jr.: Production of identical twin pregnancies by microsurgi-



Ryc. 35. A – „Prometea”, pierwszy sklonowany koń wraz z jej genetyczną dawczynią komórek somatycznych i jednocześnie biorczynią skonstruowanego zarodka. B – „Prometea” w wieku 2 lat i jej genetyczna dawczyni komórek i biorczyni (19)



Ryc. 36. Wałach „Pieraz”, dwukrotny indywidualny zwycięzca mistrzostw świata w 1994 i 1996 r. pod dwoma różnymi jeźdźcami i 12-krotny zwycięzca na dystansie 160 km i jego właścicielka Valeria Kanavy (11)



Ryc. 37. Klon „Pieraz 2” w wieku dwóch miesięcy. Po osiągnięciu dojrzałości płciowej będzie mógł być użyty jak ogier i tym samym będzie możliwe uzyskanie potomstwa po klonie „Pieraza” (11)

- cal bisection of equine embryos. Inter. Congr. Anim. Reprod. & AI, Urbana-Champaign 1984, 1, s. 241–243.
36. Allen W.R., Kydd J., Boyle M.S., Antczak D.F.: Extraspecific donkey - in horse pregnancy as a model of early fetal death. *J. Reprod. Fert.* 1987, Suppl. **35**, 197-209.
37. Palmer E., Bézard J., Magistrini M., Duchamp G.: *In vitro* fertilization in the horse: A retrospective study. *J. Reprod. Fert.* 1991, Suppl. **44**, 375-380.
38. Squires E. L., Wilson J. M., Kato H.: A pregnancy after intracytoplasmic sperm injection into equine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 1996, **45**, 306.
39. Cochran J. D., Meintjes M., Reggio B., Hylan D., Carter J., Pinto C., Paccamonti D., Godke R. A.: Live foals produced from sperm-injected oocytes derived from pregnant mares. *J. Eq. Vet. Sci.* 1998, **18**, 736–741.
40. Galli C., Crotti G., Turini P., Duchi R., Mari G., Zavaglia G., Duchamp G., Deels P., Lazzari G.: Frozen-thawed embryos produced by ovum pick up of immature oocytes and ICSI are capable to establish pregnancy in the horse. *Theriogenology*, 2002, **58**, 705 (Abstr.).
41. Grondhal C., Hansen Th., Hossanini A., Heinze I., Greve T., Hyttel P.: Intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured equine oocytes. *Biol. Reprod.* 1997, **57**, 1495–1501.
42. Li X., Morris L. H. A., Allen W.R.: Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction* 2001, **121**, 925–932.
43. Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind, Campbell K. H. S.: Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997, **285**, 810–813.
44. Vanderwall D. K., Woods G. L., Sellon D. C., Tester D. E., Chlafer D. H., White K. L.: Present status of equine cloning and clinical characterization of embryonic, fetal, and neonatal development of three cloned mules. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2004, **225**, 1694–1699.
45. Woods G. L., White K. L., Vanderwall D. K., Li G.-P., Aston K. I., Bunch T. D., Meerdo L. N., Pate B. J.: A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science* 2003, **301**, 1063–1065.
46. Galli C., Lagutina I., Crotti G., Colleoni S., Turini P., Ponderato N., Duchi R., Lazzari G.: Pregnancy: a cloned horse born to its dam twin. *Nature* 2003, **16**; 425, 680.
47. Brisson Isabelle, BBC News, www.cryozootech.com (14 April 2005).

Prof. dr hab. M. Tischner, ul. Balicka 14 B/78, 30-149 Kraków