

# Molekularne metody w analizach cytogenetycznych genomu zwierząt gospodarskich

Ewa Słota, Monika Bugno,  
Barbara Rejduch, Anna Kozubska-Sobocińska,  
Barbara Danielak-Czech

Cytogenetyka, łącząca w sobie elementy genetyki i cytologii, zajmuje się badaniem chromosomów, ich budową, morfologią, zachowaniem w procesach podziału komórek (mitotycznym i mejotycznym) oraz diagnostyką nieprawidłowości liczbowych i strukturalnych.

Badania cytogenetyczne rozpoczęły się na początku XX wieku, jednak dopiero w latach pięćdziesiątych ustalono diploidalną liczbę chromosomów człowieka. Od tego czasu rozpoczął się szybki rozwój tych badań, a wraz z nim udoskonalanie metod badawczych. Po opracowaniu technik prążkowych, umożliwiających identyfikację poszczególnych par chromosomów i ich specyficznych regionów oraz ustaleniu wzorów standardowych kariogramów podstawowych gatunków zwierząt, do badań cytogenetycznych na szeroką skalę zaczęto wprowadzać metody molekularne.

Jedną z metod, która wzbogaciła klasyczne techniki cytogenetyczne jest technika hybrydyzacji *in situ*, a przede wszystkim jej odmiana, tzw. metoda FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). W skrócie metoda ta polega na hybrydyzacji znakowanej sondy molekularnej z DNA utrwalonej na preparacie chromosomów, a następnie detekcji sygnału sondy.

Szczególnie interesujące są tzw. sondy malujące poszczególne chromosomy. Jednorodną frakcję chromosomu do produkcji takich sond uzyskuje się poprzez sortowanie chromosomów w cytometrze przepływowym lub metodą mikrodysekcji bezpośrednio z preparatu mikroskopowego przy użyciu mikromanipulatora. Wyizolowany z kilku chromosomów konkretnej pary DNA jest amplifikowany (powielany) techniką polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR) lub klonowany w odpowiednich wektorach, np. bakteryjnych.

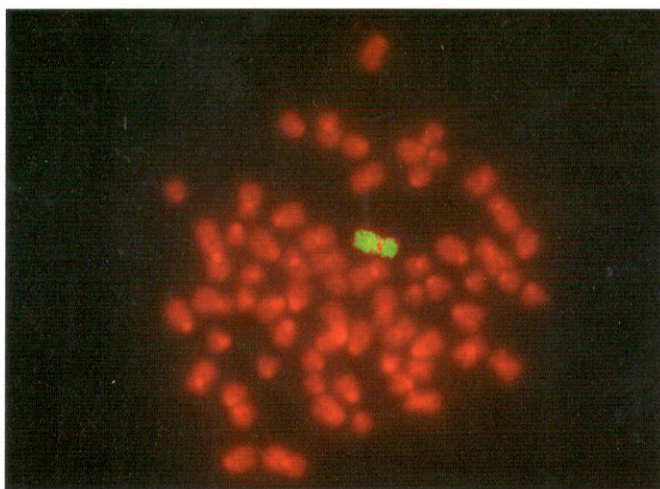
Należy podkreślić, że technika FISH z użyciem malujących sond molekularnych jest metodą drogą, pracochłonną i skomplikowaną. Wymaga perfekcyjnego przestrzegania wszystkich etapów ustalonego protokołu, takich jak uzyskiwanie jednorodnej frakcji chromosomów, amplifikacja sondy, znakowanie, denaturacja sondy i chromosomów w preparacie mikroskopowym, hybrydyzacja sondy z homologicznym chromosomem, amplifikacja sygnału. Równocześnie technika ta jest bardzo precyzyjna i może być stosowana w różnego rodzaju badaniach cytogenetycznych. Jednakże nadal w analizie cytogenetycznej zwierząt gospodarskich dominują techniki klasyczne o stosunkowo niskiej czułości i dużej pracochłonności, brak bowiem na rynku sond komercyjnych do malowania chromosomów zwierzęcych. W związku z tym w Dziale Immuno- i Cytogenetyki IZ-PIB podjęte zostały badania mające na celu opanowanie techniki produkcji sond molekularnych malujących chromosomy bądź ich fragmenty. Umożliwiło to szerokie zastosowanie techniki FISH do identyfikacji wybranych chromosomów, pogłębioną analizę ich prawidłowości oraz diagnozę zmian, obejmujących także mikrorearanżacje, zarówno w komórkach somatycznych jak i rozrodczych różnych gatunków zwierząt.

Mimo wieloletnich badań wiedza na temat aberracji chromosomowych u zwierząt wymaga licznych uzupełnień. Wprowadzenie do analiz nowoczesnych technik molekularnych zwiększyło możliwość precyzyjnej diagnozy nieprawidłowości kariotypu oraz poznanie biologicznych efektów różnego rodzaju zmian chromosomowych.

## Identyfikacja aberracji chromosomowych

Nieprawidłowości liczby lub budowy chromosomów prowadzą często do śmierci zarodkowej lub okołoporodowej, względnie do obniżenia płodności ich nosicieli. Mogą one powstawać *de novo* lub być dziedziczone po rodzicach. Ze względu na wymierne straty ekonomiczne, spowodowane nosicielstwem nieprawidłowości kariotypu, diagnozy cytogenetyczne mają ogromną wagę dla hodowli zwierząt gospodarskich. Szereg nieprawidłowości można zdiagnozować za pomocą metod klasycznych (np. trisomię chromosomów płci u bydła) lub technik prążkowych (translokacje wzajemne u świń). Jednak wiele zmian kariotypu występuje w formie mozaiki lub chimeryzmu, co oznacza, że w jednym organizmie można zdiagnozować dwie lub kilka linii komórkowych o różnym kariotypie. Procentowy udział tych linii jest bardzo różny i waha się w szerokim zakresie – od kilku do kilkudziesięciu procent. W tym przypadku technika FISH jest niezastąpionym narzędziem, ponieważ wykrycie tej nieprawidłowości determinowane jest przez następujące czynniki: typ analizowanych płytek, liczbę analizowanych płytek oraz czułość zastosowanych technik badawczych. Natomiast zaletami fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* jest możliwość prowadzenia analizy na preparatach nawet słabej jakości, wykrywanie sygnału na chromosomach o różnym stopniu spiralizacji, a co za tym idzie, możliwość analizy bardzo dużej liczby komórek. Ma to kapitalne znaczenie zwłaszcza w analizie prawidłowości kariotypu koni, ponieważ u tego gatunku większość zdiagnozowanych wad chromosomów płci występuje w formie mozaiki dwóch lub więcej linii, a procentowy udział płytek metafazowych z nieprawidłową liczbą chromosomów jest zazwyczaj bardzo niski.

Stosując sondę molekularną specyficzną dla chromosomu X konia, zdiagnozowano 26 aneuploidii, wśród których aż 23 występowało w formie mozaiki: 63,X/64,XX (19 osobników) [4, 5, 7]; 63,X/65,XXX (1 osobnik) [3]; 63,X/64,XX/65,XXX (2 osobniki) [3] oraz 63,X/64,XX/65,XX+Xp [8]. W tym przypadku aberracja została zdiagnozowana dzięki zastosowaniu sond malujących, komplementarnych do poszczególnych ramion chromosomu X koni (Xp oraz Xg), uzyskanych metodą mikrodysekcji [8]. Pozostałe zdiagnozowane aneuploidie heterosomów to 2 przypadki monosomii



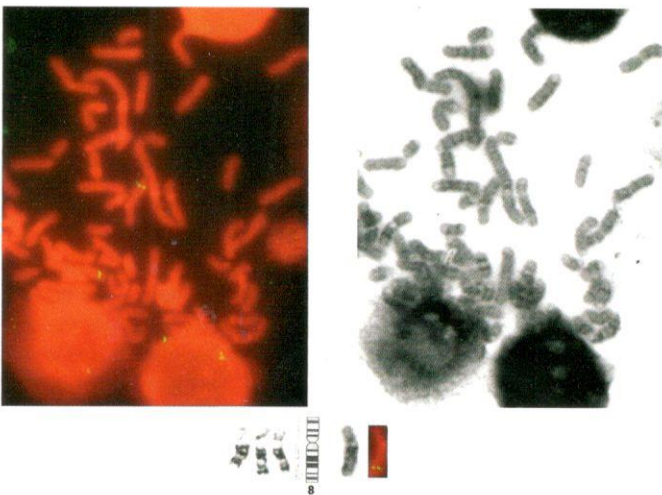
Fot. 1. Technika FISH z zastosowaniem malującej sondy specyficznej dla chromosomu X konia; u klaczy o kariotypie 63,X widoczny jeden jasny sygnał fluorescencyjny na chromosomie X

chromosomu X – kariotyp 63,X (fot. 1) [2] oraz trisomia chromosomu X – kariotyp 65,XXX [6].

Wprowadzenie mikrodysekcji oraz techniki FISH do analiz kariotypu zwierząt, prowadzonych w Dziale Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt IZ-PIB, zaowocowało wykryciem szeregu aberracji chromosomowych również u innych gatunków zwierząt gospodarskich. U bydła zdiagnozowano translokację robertsonowską, w którą zaangażowane były chromosomy pary 1. i 29. (1 przypadek) oraz trisomię chromosomów płci 61,XXY (1 przypadek) [20]. W ostatnim przypadku, sondy malujące chromosomy płci zostały pozyskane techniką mikrodysekcji heterosomów bydłeczych. Ponadto, wykorzystując sondy uzyskane metodą mikrodysekcji chromosomów oraz technikę FISH, potwierdzono diagnozę translokacji wzajemnej trcp (7;13)(q13;q46) u świni – przypadku zdiagnozowanego wcześniej wysoko rozdzielczymi technikami prążkowymi RBA i GTG [9]. W ten sposób wykazano przydatność sond malujących, uzyskanych przy pomocy mikrodysekcji chromosomów, do diagnozy translokacji wzajemnych lub innych rearanżacji chromosomowych.

### Fizyczna lokalizacja genów

Technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* może być także wykorzystana w celu uzupełniania map fizycznych chromosomów zwierzęcych. Stosując tę technikę z sondami specyficznymi dla wybranych genów i klonowanymi w wektorach bakteryjnych (sondy BACowe), zmapowano dwie grupy genów skorelowanych z występowaniem zaburzeń zdrowotnych u koniowatych (koń do-



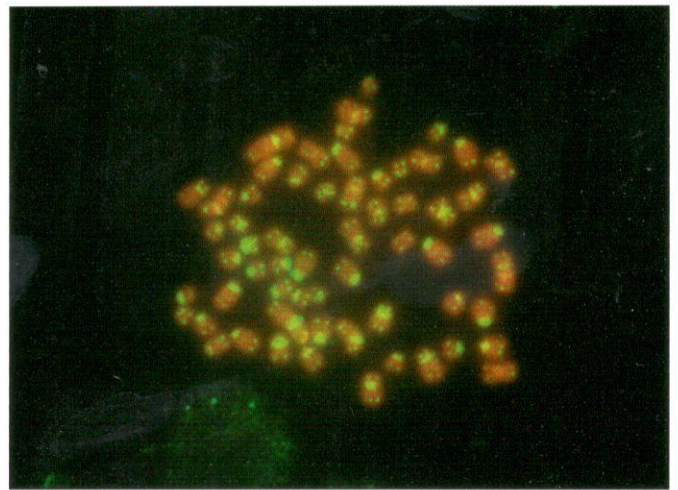
Fot. 2. Fizyczna lokalizacja genu BCL2 uwidoczniiona sygnałami fluorescencyjnymi

mowy i osioł). Do pierwszej grupy należały geny odpowiedzialne za występowanie u koniowatych, w komórkach nabłonka oskrzeli, częstej choroby wydolnościowej – nawracającej obturacji dróg oddechowych (Recurrent Airway Obstruction – RAO): CAC1, BCL2, EGFR, IL4 (fot. 2) [1, 11, 12]. Do drugiej grupy natomiast geny odpowiedzialne za występowanie chorób kośćca: TWIST 1, SHH, FRZB, PAX1 oraz GDF5 [25].

### Analiza specyficznych regionów chromosomowych

Wykorzystując molekularne techniki przeprowadzono analizę potencjalnych mechanizmów kontrolujących zmianę poziomu aktywności regionów jąderkotwórczych (NORs), poprzez eliminację rDNA (nierówny crossing-over), metylację oraz „wyciszenie” genów przez efekt pozycji w obrębie heterochromatyny lub telomerów. W tym celu wykonano analizy polegające na sekwencyjnym barwieniu chromosomów metafazowych za pomocą techniki ba-

dającej metylację chromosomów (*in situ* Nick Translation), obecność rDNA (technika FISH), obecność innych powtarzalnych sekwencji (telomery, heterochromatyna) w pobliżu rDNA (technika PRINS – fot. 3) oraz techniki wykrywającej białka transkrypcyjne rDNA (technika Ag-I). Lokalizację genów rDNA potwierdzono techniką FISH, przy użyciu sond specyficznych dla regionów organizatora jąderka, otrzymanych przy zastosowaniu metody mikrodysekcji chromosomów. W celu uwidocznienia miejsc zmetylowa-

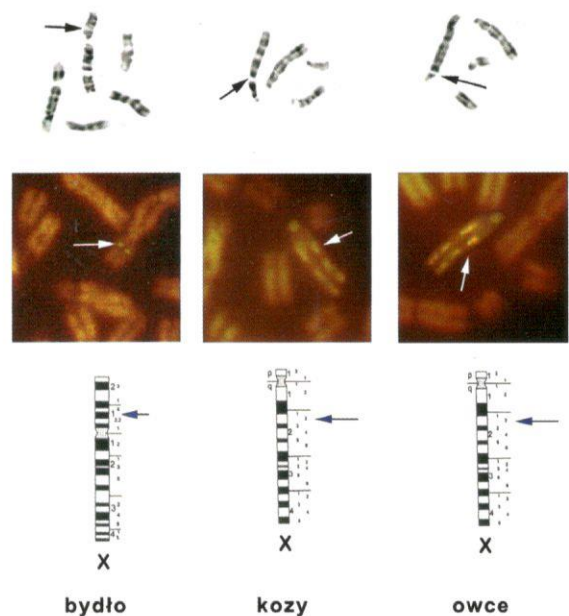


Fot. 3. Sygnały identyfikujące sekwencje telomerowe i heterochromatynowe zlokalizowane na chromosomach konia (technika PRINS)

nych, zastosowano technikę *in situ* Nick Translacji z wykorzystaniem enzymu Hpa II. Sekwencje telomerowe oraz bloki heterochromatyny konstytutywnej zostały uwidocznione za pomocą techniki PRINS po zastosowaniu specyficznych primerów dla tych regionów [21].

### Analiza niestabilności chromosomów

Struktura chromosomów ze względu na swoją wrażliwość może ulegać uszkodzeniom pod wpływem pewnych czynników mutagenicznych. W Instytucie Zootechniki-PIB, w ramach analizy zjawiska strukturalnej niestabilności chromosomu X i jego efektów fenotypowych u bydła, kóz i owiec, zidentyfikowano w regionach



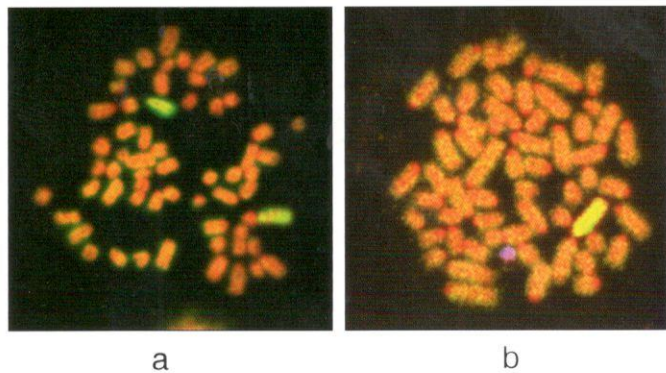
Fot. 4. Lokalizacja technika *in situ* PCR genu FMR1 u bydła, kóz i owiec

Xp13 oraz Xq22 miejsca łamliwe chromosomów, które u osobników żeńskich o obniżonej płodności wykazują szczególną podatność na uszkodzenia indukowane mutagenami. Stosując technikę *in situ* PCR, z zastosowaniem znakowanych fluorescencyjnie starterów [10, 23], w regionach tych zlokalizowano tandemowe powtórzenia CGG sekwencji regulatorowej charakterystycznej dla ludzkiego genu *FRM1* (fot. 4), związanego z łamliwością chromosomu X i częstymi przypadkami nieprawidłowego funkcjonowania jajników [24]. Biorąc pod uwagę zjawisko konserwatywności genetycznej, zachowującego homologię niektórych grup syntenicznych i licznych segmentów chromosomów człowieka i innych gatunków, badania te mogą być podstawą określenia zależności między niestabilnością specyficznych regionów chromosomu X a zaburzeniami funkcji reprodukcyjnych u zwierząt gospodarskich.

#### Wykorzystanie konserwatywności genetycznej w analizach cytogenetycznych

Możliwości diagnostyki cytogenetycznej przy stosowaniu techniki FISH znacznie rozszerza konserwatywność genetyczną, czyli podobieństwo budowy i usytuowania poszczególnych genów oraz sekwencji DNA, stwierdzany nie tylko u gatunków należących do tej samej rodziny, ale również u gatunków taksonomicznie odległych. Zjawisko konserwatywności może dotyczyć wzorów prążków chromosomowych, układu genów w grupach sprzężonych i syntenicznych, sekwencji satelitarnych, a także sekwencji nukleotydowych genów kodujących te same produkty u różnych gatunków zwierząt [22]. Konserwatywny charakter niektórych chromosomów pozwala na wykorzystanie w technice FISH szeregu sond molekularnych, uzyskanych z chromosomów jednego gatunku zwierząt, do identyfikacji homologicznych odcinków DNA u innych gatunków.

Stwierdzony konserwatywność chromosomów płci u bydła, owiec i kóz [14, 19] umożliwia zastosowanie bydłecy sond malujących heterosomy do identyfikacji chimerizmu leukocytnego XX/XY u owiec i kóz, pochodzących z ciąży mnogich różnoplciowych (fot. 5a, 5b).



Fot. 5. Sygnały identyfikujące heterosomy u koźła o kariotypie 60,XX/60,XY (po hybrydyzacji z bydłecy sondami malującymi): a – komórka linii 60,XX; b – komórka linii 60,XY

Chimerizm leukocytny XX/XY jest najczęściej spotykaną w rodzinie *Bovidae* wadą kariotypu, polegającą na występowaniu, we krwi współbliźniaków różniących się płcią, dwóch populacji komórek – o kariotypie męskim i żeńskim, co jest wynikiem wspólnego krwioobiegu między płodami (poprzez anastomozy). Dwie linie komórkowe mogą występować w różnych proporcjach, czasem jedna z nich pojawia się z bardzo niską częstością (nawet ok. 1%). Stąd ważne jest stosowanie odpowiednio precyzyjnych metod diagnostycznych, pozwalających na identyfikację chromosomów płci nawet w preparatach miernej jakości.

Konserwatywny charakter heterosomów u *Bovidae* umożliwił międzygatunkowe hybrydyzacje *in situ*, z zastosowaniem bydłecy sond malujących chromosomy płci, do diagnozy chimerizmu leukocytnego u jagniąt [13, 15] i koźląt [18], pochodzących z ciąży bliźniaczych różnoplciowych.

W wyniku hybrydyzacji (FISH) u osobników z chimerizmem leukocytnym identyfikowano dwie linie komórkowe różniące się heterosomami: w linii XX rejestrowano dwa jednakowe sygnały fluorescencyjne, charakterystyczne dla sondy specyficznej dla chromosomu X; w linii komórkowej XY obserwowano natomiast dwa różne sygnały, z których jeden ujawniał hybrydujący z sondą chromosom Y, a drugi – chromosom X [15, 18].

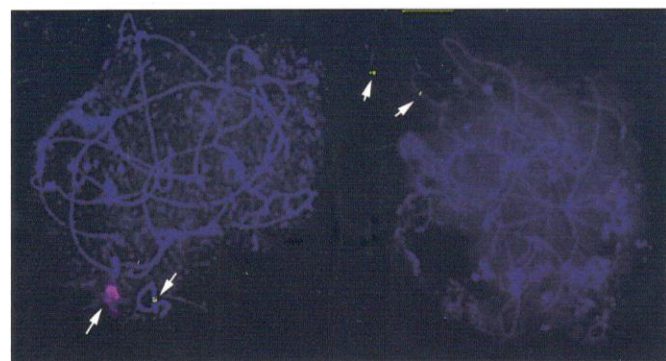
Technika FISH, dając bardzo czytelne sygnały w dużej liczbie płytek (u każdego osobnika analizuje się 100 płytek poddanych hybrydyzacji), umożliwia nie tylko stwierdzenie chimerizmu leukocytnego, ale także określenie udziału procentowego poszczególnych linii komórkowych XX : XY.

Konserwatywność genetyczną heterosomu Y u gatunków należących do *Bovidae* umożliwił także wykorzystanie bydłecy sondy malującej do identyfikacji chromosomu Y w nasieniu tryka [16].

Konserwatywność chromosomu X u *Bovidae* pozwolił na hybrydyzacje porównawcze dotyczące prążka Xq24 (zawierającego gen *Xist*), uzyskanego techniką mikrodysekcji z bydłecy chromosomów metafazowych, i zastosowanie go jako sondy do lokalizacji homologicznych sekwencji u owiec i kóz. U owiec gen *Xist* (odpowiedzialny za inaktywację chromosomu X) zlokalizowano w prążku Xq2 i w tym samym miejscu gen ten zlokalizowano u kóz.

#### Ocena chromosomów mejozycznych u buhajów – nosiciele chimerizmu 60,XX/60,XY

Preparaty chromosomów mejozycznych od buhajów – nosiciele chimerizmu leukocytnego, analizowano przy wykorzystaniu techniki FISH i sond molekularnych identyfikujących heterosomy X i Y. Głównym przedmiotem obserwacji w komórkach rozrodczych buhajów był bivalent złożony z chromosomów płci, a zwłaszcza jego spontaniczna, wczesna dysocjacja. W analizowanych spermatocytach I rzędu obserwowano zaburzenia w przebiegu koniugacji chromosomów u buhajów – nosiciele chimerizmu 60,XX/60,XY. W dwóch przypadkach stwierdzono, w jednym ze stadiów mejozy (późny pachyten), wczesną dysocjację bivalentów złożonych z heterosomów – w pierwszym przypadku X-Y, w drugim X-X (fot. 6). Obecność spermatocytów I rzędu, zawierających chromosomy



Fot. 6. Technika FISH spermatocyty I rzędu (późny pachyten) buhajów 60,XX/60,XY; żółty sygnał hybrydyzacyjny – chromosomy X; czerwono-fioletowy sygnał hybrydyzacyjny – chromosom Y

XX w gonadach buhajów – nosiciele chimerizmu leukocytnego, potwierdziło możliwości migracji wraz ze „strumieniem krwi” pierwotnych komórek rozrodczych między współpartnerami okresu

życia płciowego. Taki wynik pozwala na wyjaśnienie przyczyn obniżenia płodności buhajów pochodzących z ciąży bliźniaczych różnopłciowych [17].

**Literatura:** 1. Bugno M., Klukowska-Rötzler J., Słota E., Witarowski W., Gerber V., Leeb T., 2007 – Fluorescent in situ hybridization mapping of the epidermal growth factor receptor gene in donkey. *J. Anim. Breed. Genet.* 124 (w druku). 2. Bugno M., Słota E., Kościelny M., 2007 – Karyotyp evaluation among young horse populations in Poland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 5 (w druku). 3. Bugno M., Słota E., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., 2007 – *Acta Vet. Hung.* 55, 2, 207-212. 4. Bugno M., Słota E., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., 2005 – *Rocz. Nauk. Zoot.* 32, 1, 11-17. 5. Bugno M., Słota E., Tischner M. (Jr), Tischner M., 2003 – *Ann. Anim. Sci.* 3, 2, 207-212. 6. Bugno M., Słota E., Wieczorek M., Yang F., Buczyński J., Świtoński M., 2003 – *Equine Vet. J.* 35, 2, 109-110. 7. Bugno M., Słota E., Ząbek T., 2001 – *Ann. Anim. Sci.* 1, 2, 5-9. 8. Bugno M., Słota E., 2007 – *Acta Vet. Hung.* 55, 3 (w druku). 9. Danielak-Czech B., Słota E., Bugno M., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., 2006 – *Ann. Anim. Sci.* 6, 219-224. 10. Fu Y-H., Kuhl D.P.A., Pizzutti A., Pieretti M., Richards S., Verkerk A.J.M.H., Warren S.T., Oostra B.A., Nelson D.L., Caskey C.T., 1991 – *Cell* 67, 1047-1058. 11. Klukowska-Rötzler J., Bugno M., Sander P., Słota E., Dolf G., Chowdhary B.P., Leeb T., Gerber V., 2006 – *Hereditas* 143, 138-141. 12. Klukowska-Rötzler J., Bugno M., Słota E., Robinson E., Plumi F., Gu-

erin G., Dolf G., Gerber V., 2005 – *Anim. Genet.* 36, 6, 517-519. 13. Kozubska-Sobocińska A., Słota E., Pieńkowska A., 2003 – *Med. Wet.* 59, 987-989. 14. Kozubska-Sobocińska A., Słota E., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., 2005 – *Ann. Anim. Sci.* 5, 1, 5-9. 15. Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Radko A., Rychlik T., Słota E., 2004 – *J. Anim. Breed. Genet.* 121, 197-203. 16. Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Słota E., 2005 – *Rocz. Nauk. Zoot.* 32, 1, 5-9. 17. Rejduch B., 2001 – *Rocz. Nauk. Zoot. Monografie i Rozprawy*, 1-62. 18. Rychlik T., Kozubska-Sobocińska A., Rejduch B., Sikora J., 2005 – *Vet. Med. Czech.* 50, (7), 311-314. 19. Słota E., Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Żyga A., Natonek M., 2001 – *Anim. Sci. Pap. Rep.* 19, 3, 203-208. 20. Słota E., Kozubska-Sobocińska A., Kościelny M., Danielak-Czech B., Rejduch B., 2003 – *J. Appl. Genet.* 44, 379-382. 21. Słota E., Wnuk M., Bugno M., Pieńkowska-Schelling A., Schelling C., Bratuś A., Kotylak Z., 2007 – *J. Anim. Breed. Genet.* 124, 1-9. 22. Świtoński M., 1992 – *Mat. Konf. XI Zjazdu PTG „Genetyka 2000”*, 13-18. Kraków, 1992. 23. Troyer D.L., Goad D.W., Xie H., Rohrer G.A., Alexander L.J., Beattie C.W., 1994 – *Cytogenet. Cell Genet.* 67, 199-204. 24. Wittenberger M.D., Hagerman R.J., Sherman S.L., McConckie-Rosell A., Welt C.K., Rebar R.W., Corrigan E.C., Simpson J.L., Nelson L.M., 2007 – *Fertil. Steril.* 87, 456-465. 25. Ząbek T., Bugno M., Klukowska-Rötzler J., Uhlmann B., Gerber V., Słota E., 2007 – Assignment of five equine genes responsible for development of skeletal and neural system. *Anim. Genet.* (w druku).

## Aktualny stan i znaczenie metod kriokonserwacji oocytów i zarodków świni

Barbara Gajda, Zdzisław Smorąg

Niektóre z biotechnologicznych metod rozrodu świń są już obecnie elementem fermowej hodowli trzody chlewnej. Właściwy postęp hodowlany, a także dobry wynik ekonomiczny hodowli świń nie jest bowiem możliwy bez uzyskania zadowalającego poziomu rozrodności. Wydajne technologie konserwacji zarodków poszerzyłyby możliwość osiągnięcia tego celu. Opracowanie efektywnych metod kriokonserwacji zarodków świń stworzyłoby dogodne warunki międzynarodowego obrotu zarodkami, eliminując wiele problemów, np. związanych z eksportem i importem zwierząt. Ponadto, rozwój nowych technologii w rozrodzie świń, takich jak pozaustrojowe zapłodnienie i produkcja zarodków *in vitro*, czy też dotyczących uzyskiwania zwierząt transgenicznych i ich klonowania, wiążą się z dużym zapotrzebowaniem na oocyty i zarodki. Dysponowanie materiałem kriokonserwowanym byłoby w tej sytuacji dużym ułatwieniem organizacyjnym.

Jednym z ważnych kierunków wykorzystania kriokonserwacji oocytów i zarodków jest użycie tej metody w programach zachowania bioróżnorodności zwierząt. Technologia ta może być zastosowana jako metoda pomocnicza w utrzymywaniu populacji chronionych żyjących na wolności, do rekonstrukcji ras w przypadku ich zanikania lub istotnej redukcji liczby zwierząt danej rasy oraz do tworzenia nowych linii lub ras.

### Kriokonserwacja zarodków

Pomimo znaczących osiągnięć kriobiologii dotyczących konserwacji gamet i zarodków wielu gatunków zwierząt gospodarskich, przez długi czas nie udawało się opanować metod kriokonserwacji

zarodków świni. Przyczyną niepowodzeń okazała się duża wrażliwość zarodków tego gatunku na schładzanie, nawet w zakresie temperatur plusowych [65]. Doświadczenia wykazały, że temperatura, w której następowało zamieranie zarodków mieściła się w granicach od +15 do +10°C [51]. Próby schładzania zarodków świń w obecności związków osłaniających, takich jak DMSO czy glicerol, nie prowadziły do wzrostu ich odporności na niskie temperatury [46]. W kolejnych badaniach wykazano, że podatność zarodków świni na ochładzanie uzależniona jest, w większym stopniu niż to ma miejsce u innych gatunków, od stadium rozwoju zarodka [43]. Stwierdzono między innymi, że istnieje znacząca różnica we wrażliwości na niskie temperatury między wylęglą blastocystą a wcześniejszymi stadiami rozwoju zarodka. W innych badaniach [20, 43] wykazano, że wrażliwość na niskie temperatury zależy od tego czy rozwój zarodka odbywał się *in vitro*, czy *in vivo*. Blastocysty wylęgłe w hodowli *in vitro* są mniej podatne na uszkodzenia w obniżonych temperaturach plusowych niż blastocysty wylęgłe *in vivo* [43]. Specyficzna wrażliwość na niskie temperatury zarodków świni manifestuje się również ich obniżoną podatnością na kriokonserwację.

### Czynniki warunkujące podatność na kriokonserwację zarodków świni

Z badań prowadzonych w ciągu ostatnich kilkunastu lat wynika, że głównymi czynnikami warunkującymi podatność zarodków świni na kriokonserwację są: stadium zarodka i jego stan fizjologiczny, wysoka zawartość lipidów, rodzaj użytych związków osłaniających oraz metoda kriokonserwacji.

W początkowych badaniach stwierdzono, że wczesne stadia – od zygoty do moruli i wczesnej blastocysty – nie przeżywają kriokonserwacji [17]. Wszystkie pozytywne rezultaty, jakie zanotowano w kriokonserwacji zarodków świni, osiągnięte zostały wtedy, gdy zarodki znajdowały się w stadiach od ekspandującej do wylęgłej blastocysty [cyt. za 20]. Z badań własnych [17] nad witrifikacją zarodków świń wynikało, że blastocysty (fot. 1 i 2) przeżywały na poziomie około 30%, podczas gdy nie przeżył żaden zarodek w stadium moruli.

Podatność na kriokonserwację zarodków świni uzależniona jest, jak już wcześniej zaznaczono, także od tego, czy rozwój za-