



Manipulacje komórkami embrionalnymi ptaków

Marek Bednarczyk

Oddział Badawczy Drobiarstwa, Instytut Zootechniki,
Zakrzewo k. Poznania

Embryonic birds' cell manipulation

Summary

Because of easy access to the developing embryo in the laid eggs, chicken embryos have been used as a favorite model in embryology and developmental biology. Several experiments have demonstrated that pluripotent blastodermal cells (BC) from stage X chicken embryo can be removed, dispersed, and injected into the subgerminal cavity of recipient embryos at the same stage of development. These blastodermal cells are able to colonize somatic tissues of treated embryos and can contribute to the germline, because stage X blastodermal cells obtained from freshly laid eggs contain primordial germ cells (PGC) or their precursor cells. In this overview the methods and two principal applications of chicken embryo cells manipulation are: 1) production of transgenic birds, and 2) preserving and reconstituting poultry foundation stocks were presented.

Key words:

chicken, blastodermal cells, primordial germ cells, germline chimera.

1. Wstęp

Zarodek kurzy jest doskonałym modelem doświadczalnym w różnych badaniach z zakresu biologii rozwoju, embriologii, histologii, anatomii, fizjologii, medycyny, itd. Sprzyja temu specyficzny cykl rozwojowy ptaków. Jajo ptaka zostaje zapłodnione w lejku jajowodu, po czym przesuwana się wzdłuż jajowodu, gdzie zostaje otoczona błonami. W tym czasie zachodzi w nim brudkowanie, któremu podlega tylko tarczka zarodkowa, położona na powierzchni jaja, na biegunie animalnym. W konsekwencji

Adres do korespondencji

Marek Bednarczyk,
Oddział Badawczy
Drobiarstwa,
Instytut Zootechniki,
Zakrzewo k. Poznania,
62-069 Pałędzie.

biotechnologia

1 (60) 36-47 2003

w momencie zniesienia jaja (około 24 h po zapłodnieniu) tarczka zarodkowa, licząca około 40 000-60 000 komórek stanowi blastodermę, oddzieloną od masy żółtkowej w części centralnej jamą podzarodkową.

Na podkreślenie zasługuje także łatwość izolacji tarczki zarodkowej z żółtka, a zwłaszcza właściwości komórek embrionalnych ptaków będących w momencie zniesienia w X-XII stadium rozwoju (1).

Początkowo wiele przyczyn złożyło się na dużo mniejsze zainteresowanie metodami biotechnologii w produkcji drobiarskiej. Jedną z nich jest możliwość uzyskania znacznie szybszego niż u ssaków, postępu genetycznego w liniach ptaków selekcyonowanych metodami genetyki populacji. Sprzyjają temu możliwości reprodukcyjne ptaków, np. od kury uzyskuje się kilkaset sztuk potomstwa w ciągu roku. Krótki odstęp między pokoleniami (około 7-8 miesięcy), pozwala natomiast na uzyskanie dużej liczby potomstwa zarówno po ojcu jak i od jednej matki. Możliwość wyboru najlepszych reproduktorów, stanowiących zaledwie kilka procent spośród kilkudziesięciu tysięcy ocenianych osobników oraz różnorodność ras, a zwłaszcza wyspecjalizowanych homozygotycznych linii ptaków, umożliwiają ponadto szerokie wykorzystanie w ich hodowli zjawiska heterozji (2).

2. Manipulacje komórkami zarodkowymi

Marzullo (3) wykazał po raz pierwszy, że rozproszone komórki blastodermalne (BC), izolowane z tarczki zarodkowej po zniesieniu jaja, zachowują swój potencjał i po iniekcji do zarodka biorcy podlegają dalszemu rozwojowi. Niektóre z iniekowanych komórek ulegają zróżnicowaniu do melanocytów, co manifestuje się odpowiednią pigmentacją upierzenia manipulowanych zarodków. W podobnym doświadczeniu, uzyskano pisklę charakteryzujące się fenotypowym chimeryzmem melanocytów i erytrocytów (4). Po czym okazało się, że 0,3% potomstwa tego koguta powstało w wyniku zapłodnienia plemnikami pochodzącymi z komórek dawców. Zostało to potwierdzone zarówno w wyniku oceny barwy upierzenia jak i analizy DNA jego potomstwa.

Wyniki tych doświadczeń stały się podstawą oryginalnej hipotezy, że z jednej strony komórki blastodermalne, w momencie zniesienia jaj zachowują właściwości totipotentne, z drugiej zaś zawierają pewną liczbę prekursorów pierwotnych komórek płciowych. Rola tych ostatnich (pierwotne komórki płciowe – *primordial germ cells*, PGC) w różnicowaniu płci ptaków była znana od dawna (cyt. za 5). Jednak ich cykl rozwojowy, a przede wszystkim lokalizacja w kolejnych fazach rozwoju zarodka opisana została znacznie później (6). Obecnie wiadomo, że komórki macierzyste PGC zlokalizowane są w obrębie pola jasnego tarczki zarodkowej w X stadium rozwoju zarodkowego i przechodzą do hipoblastu pomiędzy XI a XIII stadium.

W kolejnych doświadczeniach udowodniono, że iniekowane komórki blastodermalne dawców ulegają wbudowaniu i zróżnicowaniu w różnych tkankach somatycz-

nych zarodków biorców (7,8), natomiast pierwotne komórki płciowe zdolne są do rozwoju i podlegają normalnej migracji do gonad biorcy, gdzie zachowują możliwości różnicowania i produkcji funkcjonalnych gamet (9).

3. Tworzenie chimer ptaków

Możliwości tworzenia chimer kręgowców, w wyniku manipulacji ich komórkami znane są od dawna (10). Także w odniesieniu do ptaków prowadzono odpowiednie manipulacje. Wykorzystując m.in. odpowiednie markery morfologiczne w celu zbadania i /lub identyfikacji odmiennych typów komórek w organizmie chimery (11).

Zainteresowanie tworzeniem chimer ptaków wzrosło w ostatniej dekadzie, po tym jak cytowany już Petite i in. (4) wykazał możliwość użycia komórek blastodermalnych kury do produkcji nie tylko chimer fenotypowych, ale także chimer płciowych.

Pierwotne komórki płciowe stanowią teoretycznie doskonałe narzędzie do produkcji chimer płciowych. Jednak chimery po iniekcji PGC uzyskano jedynie w kilku laboratoriach na świecie, a przeżywalność zarodków biorców jest znacznie ograniczona. Ponadto należy podkreślić, że procedura izolacji PGC oraz ich iniekcja do zarodków biorców jest skomplikowana. Wymaga bowiem pobrania krwi od zarodków będących w 14-17 stadium rozwoju (około 50-64 godz. inkubacji) i izolacji komórek. Ta ostatnia przypomina przysłowiowe „szukanie igły w stogu siana”, zważywszy, że w tym stadium w całym zarodku znajduje się, jak się szacuje maksymalnie około 200 pierwotnych komórek płciowych. Najczęściej stosowane procedury, to wirowanie krwi w gradiencie Ficollu (12) lub izolacja z wykorzystaniem odpowiednich markerów immunologicznych (13). Równie skomplikowana jest iniekcja od 100 do 1000 PGC (14,15) do naczyń krwionośnych kilkudziesięciogodzinnego zarodka biorcy, w taki sposób aby nie uległy one uszkodzeniu.

Tak zatem narzędziem z wyboru do produkcji chimer ptaków, jak się wydaje, zgodnie z obecnym stanem wiedzy są komórki blastodermalne. Podstawowe znaczenie miało opracowanie efektywnej, powtarzalnej metody produkcji chimer, toteż wiele prac poświęcono badaniom mechanizmów ich powstawania. Miejsce pobrania komórek (centralna lub peryferyjna część blastodermi), miejsce iniekcji, jak również wiek iniekowanych zarodków wpływał na potencjał rozwojowy komórek dawców w blastodermie zarodków biorców (9,16).

Wielu autorów wskazuje na bardzo niską przeżywalność zarodków biorców (4,17,18). Spośród, np. 408. manipulowanych jaj wylęgło się jedynie 2,8%, podczas gdy w grupie kontrolnej, nie manipulowanej od 61 do 92% piskląt (19). Wysoka zamieralność iniekowanych zarodków obserwowana była również przez Thorawala i in. (20). Uzyskano także lepsze wyniki (wylęgowość 40,3%), w efekcie prostej modyfikacji techniki wykonania otworu w skorupie jaja (21).

Przeżywalność zarodków biorców drastycznie zmniejsza się w czasie pierwszych dni legu (18,22). Wymienić można co najmniej kilka czynników zwiększających pro-

cent chimer somatycznych i płciowych: liczba iniekowanych komórek (23), naświetlanie promieniowaniem gamma zarodków biorców (7,9) oraz odpowiedni dobór pary biorca-dawca (7). Podstawowym jest jednak odpowiednio wysoka przeżywalność traktowanych zarodków biorców, po iniekcji komórek blastodermalnych dawców.

Zaproponowana w naszym laboratorium metoda (24), polegająca m.in. na:

1) doborze odpowiedniego genotypu dawcy komórek,

2) wykonaniu otworu manipulacyjnego w tępych końcu jaja, nad komorą powietrzną,

3) odpowiednim doborze warunków manipulacji komórkami i inkubacji jaj po iniekcji, pozwoliła na istotne zmniejszenie wczesnej zamieralności manipulowanych zarodków i w konsekwencji kilkukrotne zwiększenie wylęgowości piskląt, biorców komórek (tab. 1). Ponadto na istotne zwiększenie, w porównaniu z metodą tradycyjną, liczby piskląt fenotypowych chimer (rys. 1).

Tabela 1

Wpływ metody iniekcji komórek blastodermalnych na wylęgowość manipulowanych zarodków*

Metoda	Powtórzenie						Łącznie
	1	2	3	4	5	6	
A							
liczba traktowanych zarodków	53	22	25	43	•	•	143
wylęgowość (%)	7,5	4,5	16,0	11,6			9,8 A
B							
liczba traktowanych zarodków	15	17	18	16	16	23	105
wylęgowość (%)	46,7	35,3	50,0	25,0	37,5	47,8	40,9 B

* na podstawie (24).

A, B – wartości oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P < 0,01$.

Zaletą zaproponowanej metody, jest statystycznie istotna redukcja wczesnej zamieralności manipulowanych zarodków. Jej konsekwencją była wyższa wylęgowość (40,9%; 43/105), w porównaniu z metodą konwencjonalną (9,8%; 14/143). Średnia wylęgowość (40,9%), wyliczona na podstawie sześciu powtórzeń jest wyższa od najlepszych publikowanych dotychczas wyników (8,25). Przy czym należy podkreślić, że metoda własna (24) jest znacznie łatwiejsza w porównaniu z proponowaną przez cytowanych autorów, wymagającą transferu czterodniowych zarodków do skorup zastępczych.

Odrębnym zagadnieniem jest uzyskiwany procent chimer fenotypowych i płciowych, wśród piskląt wylęzonych z manipulowanych zarodków. Chcąc ten procent zwiększyć starano się zawęzić stosunek liczbowy pomiędzy liczbą komórek biorców i dawcy. W tym celu realizowano dwie strategie. Pierwsza polega na zwiększeniu



Rys. 1. Pisklę chimera powstałe po iniekcji komórek blastodermalnych dawcy (Zk) do zarodków biorców (WI). Ciemne zabarwienie puchu – fenotypowy marker chimeryzmu.

liczby komórek lub objętości zawiesiny iniekcyjnej, wprowadzanej do jamy podzarodkowej zarodków (4,7,23). Druga natomiast dotyczy osłabienia potencjału rozwojowego zarodków biorców, w wyniku ich traktowania promieniowaniem gamma (7) lub preparatami chemicznymi (26), co miałyby faworyzować rozwój komórek dawcy.

W badaniach prowadzonych w Oddziale Badawczym Drobiarstwa IZ, poświęconych temu zagadnieniu (5), stwierdzono ciekawą prawidłowość. Większość zarodków napromieniowanych dużymi dawkami (6 i 7 Gy), ale nie poddanych iniekcji zamierała do 3. doby (72-82%), a pozostałe do 9. doby lęgu. Natomiast iniekcja zawiesiny komórek blastodermalnych, niezależnie od jej objętości, do jamy podzarodkowej napromieniowanych biorców powodowała nie tylko zasadniczą zmianę krzywej zamieralności, bowiem w pierwszych 3 dobach lęgu zamierało ich znacznie mniej (30-65%), ale przede wszystkim umożliwiała wyląg piskląt (grupa napromieniowana 6 Gy). Interpretując te wyniki, można przypuszczać, że w omawianych badaniach dawka 6 Gy była krytyczną, letalną dla zarodków biorców, nie poddanych iniekcji

komórek blastodermalnych, ale umożliwiającą ich rozwój, o ile nastąpiła iniekcja dodatkowych komórek, pochodzących od dawcy. Kontynuując ten tok myślenia można przypuszczać, że wszystkie pisklęta wylęzione w tych grupach były w rzeczywistości chimerami, niezależnie od możliwości identyfikacji chimeryzmu na podstawie markera fenotypowego (barwy upierzenia).

Potwierdzeniem tej hipotezy są badania (5,27) nad identyfikacją chimeryzmu w różnych typach komórek: melanocytach (marker – ciemna barwa upierzenia), gruczołu skorupowego (marker – ciemna barwa skorupy), erytrocytach (marker – DNA) i plemnikach lub oocytach (marker – wyląg piskląt rasy dawcy komórek), których wyniki zestawiono w tabeli 2. Do identyfikacji chimeryzmu w erytrocytach (18,8%), wykorzystano charakterystyczny dla Zielononóżki kuropatwianej fragment DNA (28) o długości ok. 780 pz, identyfikowany w reakcji RAPD – PCR, z 10-nukleotydowym starterem GTTTCGCTCC. W przedstawionych wynikach wskazuje się, że komórki/tkanki biorców były w statystycznie różnym stopniu kolonizowane przez komórki dawcy. W największym komórki gruczołu skorupowego (71,5%), a w najmniejszym melanocytów (17,1%), o ile dawcą były kury rasy *Barred Plymouth Rock*. Na podkreślenie zasługuje fakt, że na procent chimeryzmu istotny wpływ miał genotyp dawcy komórek *Barred Plymouth Rock* (17,1%) lub Zielononóżka kuropatwiana (56,5%). Interesujący jest zwłaszcza wysoki procent chimer płciowych (31,0%), uzyskany po iniekcji do zarodków biorców, komórek blastodermalnych.

Tabela 2

Częstotliwość chimeryzmu w różnych komórkach biorców*

Komórki	Marker	Liczba obserwacji	Liczba chimer (%)
melanocyty	ciemna barwa upierzenia	70	12 (17,1) a
dawca (rasa kur): <i>Barred Plymouth Rock</i>		69	39 (56,5) b
Zielononóżka kuropatwiana			
gruczołu skorupowego	ciemna barwa skorupy	186	133 (71,5) c
erytrocyty	fragmenty DNA	16	3 (18,75) a
plemniki i oocyty	pisklęta Zn lub BPR w F ₂ (krzyżowanie wsteczne)	29	9 (31,0) ab

*na podstawie wyników: (27,5);

a, b, c, – wartości oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie przy $P < 0,05$.

Opisana efektywna, mniej pracochłonna, a przede wszystkim umożliwiająca uzyskanie nie tylko chimer fenotypowych, ale także znaczny odsetek chimer płciowych metoda własna umożliwia rutynową, regularną ich produkcję, a zatem otrzymanie

licznej, unikatowej populacji chimer, mogących stanowić podstawę rozwoju różnorodnych, często potencjalnych do tej pory kierunków badawczych.

4. Możliwości praktycznego wykorzystania chimer

W ostatnim dziesięcioleciu prowadzono intensywne badania nad praktycznym wykorzystaniem możliwości tworzenia chimer w wyniku manipulacji komórkami embrionalnymi ptaków. Dotyczą one dwóch podstawowych kierunków:

- 1) produkcji ptaków transgenicznych oraz
- 2) biokonserwacji genotypów.

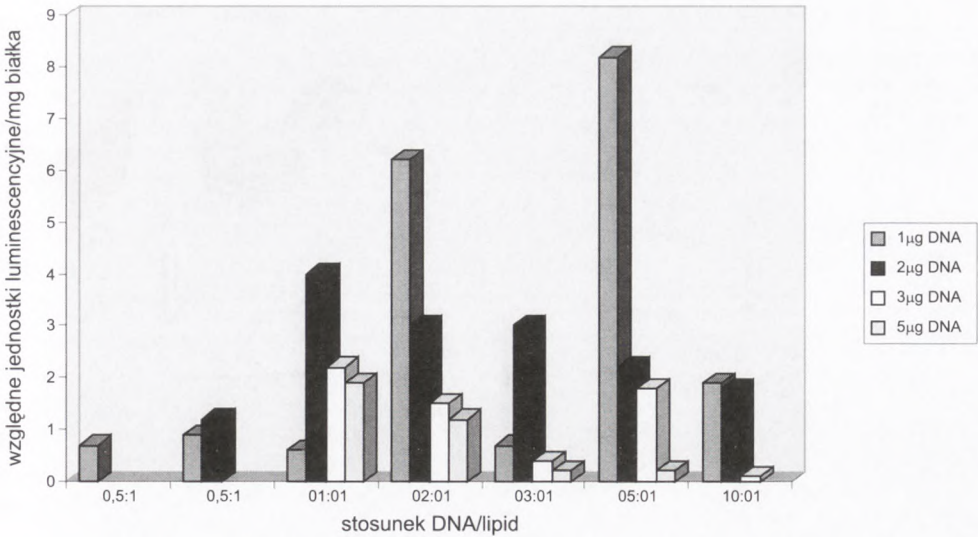
Od kilku lat rozwijają się badania nad wykorzystaniem komórek embrionalnych: komórek blastodermalnych lub pierwotnych komórek płciowych do wprowadzania egzogenego DNA do zarodka kury. Według aktualnego stanu wiedzy tworzenie transgenicznych ptaków z wykorzystaniem komórek blastodermalnych może być metodą z wyboru.

Komórki blastodermalne znajdują zastosowanie w produkcji ptaków transgenicznych, bowiem mogą być przetrzymywane w kulturze przez wiele dni poprzedzających iniekcje do zarodków biorców (29) oraz mogą być modyfikowane genetycznie *in vitro*, na drodze lipofekcji (30) lub elektroporacji (31). Te właściwości czynią komórki blastodermalne idealnym wektorem do wprowadzania modyfikacji genetycznych do komórek szlaku płciowego.

W ostatnich latach pojawiły się lapidarne informacje o uzyskaniu zmodyfikowanych genetycznie ptaków, posiadających właściwości produkcji specyficznych białek. Badania te zostały jednak zmonopolizowane przez wyspecjalizowane firmy komercyjne (Origen Therapeutics, Inc.; AviGenics i inne), czego efektem jest niestety brak dalszych publikacji, opisujących uzyskane wyniki.

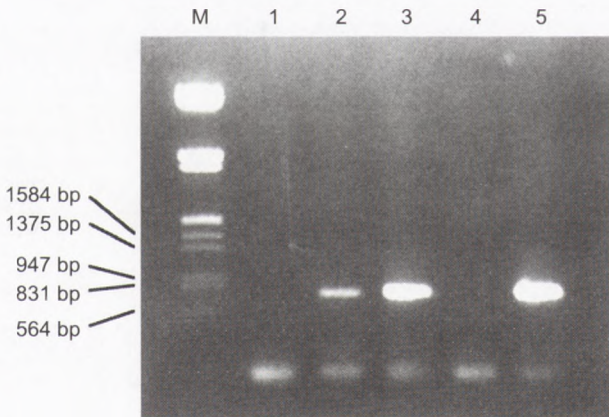
W kraju, w Oddziale Badawczym Drobiarstwa IZ oraz Instytucie Biotechnologii i Antybiotyków PAN podjęto wspólnie, badania nad wprowadzaniem egzogenego DNA do komórek blastodermalnych, z zamiarem tworzenia ptaków bioreaktorów, produkujących w białku jaja kurzego białka ludzkie o charakterze leczniczym. Skonstruowano wektory plazmidowe (32), wyposażone w specyficzne sekwencje regulacyjne, umożliwiające ocenę ekspresji wybranych genów w komórkach blastodermalnych kury *in vitro*. Jako element regulujący ekspresję obcych genów w jajowodzie wybrano promotor ovoalbuminy, podstawowego białka jaja kurzego. Do wektorów włączono geny reporterowe, np. gen lucyferazy (*Luc*) lub GFP (*green fluorescence protein*), których poziom ekspresji łatwo kontrolować w celu optymalizacji warunków transfekcji.

W pierwszym etapie (33) optymalizowano warunki lipofekcji (rys. 2) stwierdzając, że ekspresja *Luc* uzależniona była od koncentracji komórek, rodzaju stosowanego kompleksu lipidowego, plazmidu DNA, proporcji lipid/DNA oraz warunków fizycznych reakcji.

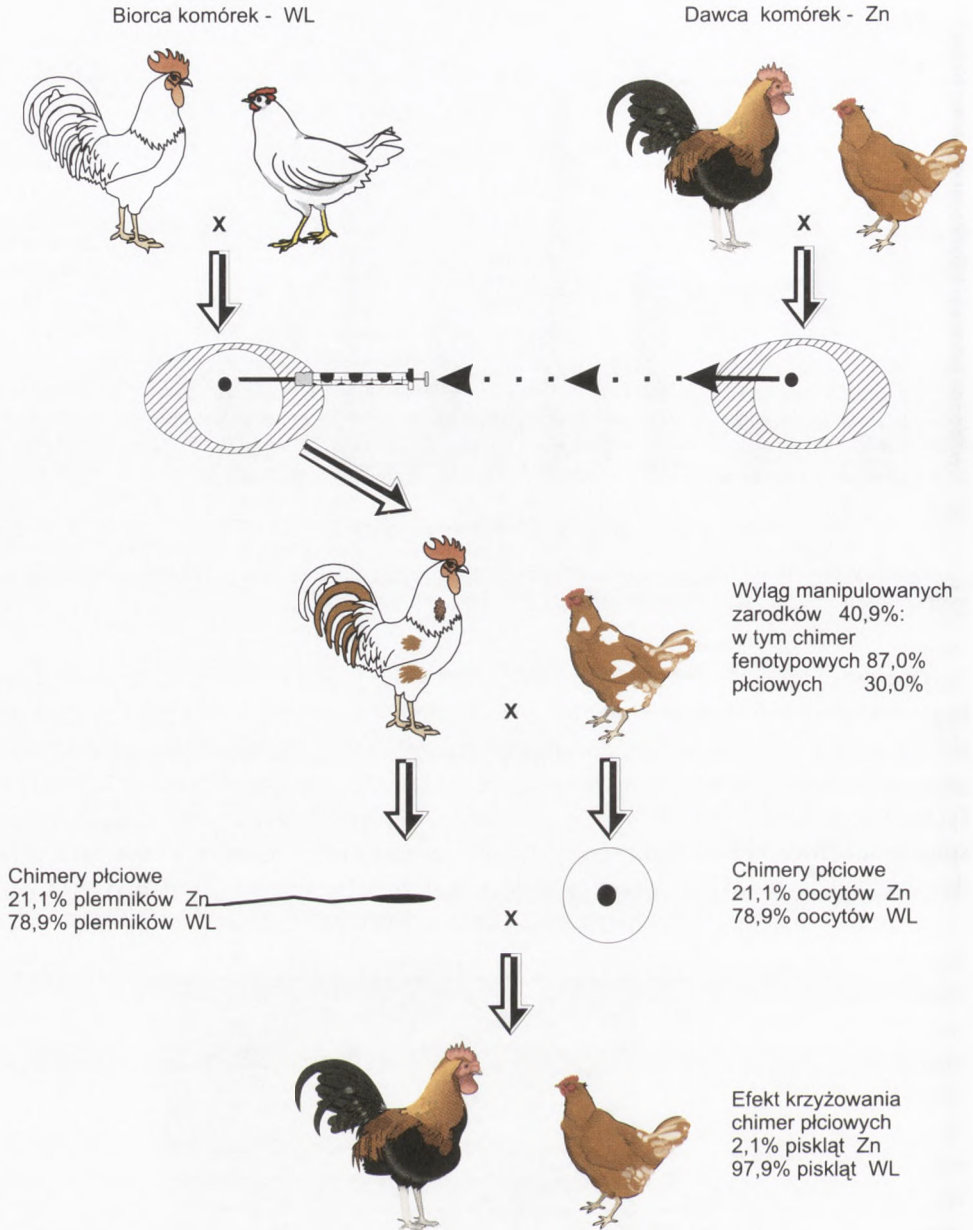


Rys. 2. Wpływ ilości DNA i stosunku DNA/lipid na ekspresję genu lucyferazy (względne jednostki luminescencyjne/mg białka) w komórkach blastodermalnych kury.

Obecność innych genów w komórkach i tkankach ptaków weryfikowano (34) na bazie obecności zielonego białka fluorescencyjnego lub metodą PCR (rys. 3). Zakłada się, że kury w których genom zostanie włączony konstruk, składający się z obcego genu umieszczonego pod kontrolą promotora owoalbuminy, będą wytwarzały w części białkotwórczej jajowodu obce białko, które będzie wydalone wraz z jajem. W ten sposób możliwe będzie tworzenie ptaków bioreaktorów o zmodyfikowanym składzie białka jaja, umożliwiającym produkcję białek o charakterze terapeutycznym.



Rys. 3. Identyfikacja genu interferonu $\alpha 2a$ w transfekowanych komórkach blastodermalnych kury. M – marker wielkości; 1, 2, 3 – grupy doświadczalne (transfekowane komórki blastodermalne), 4 – kontrola negatywna (bez DNA), 5 – kontrola pozytywna (plazmid).



Rys. 4. Schemat odtworzenia populacji Zielononóżki kuropatwianej (Zn).

Inne, praktyczne zastosowanie komórek blastodermalnych wynika z możliwości ich mrożenia i długotrwałego przetrzymywania przed iniekcją do zarodków biorców (8,35). Uzyskane w ten sposób chimery płciowe, odpowiednio krzyżowane,

mogą odtworzyć genotyp dawców BC (25), dzięki czemu nie jest konieczne kosztowne utrzymanie unikatowych genotypów ptaków metodą *in situ* (36).

W najnowszych badaniach (37), udowodniono możliwość odtworzenia rodzimej populacji Zielononózki kuropatwianej (Zk), dawców komórek blastodermalnych, w wyniku krzyżowania chimer płciowych (38), zgodnie z przedstawionym na rysunku 4 sposobem postępowania. Najciekawsze jednak, że wykazano w oparciu na badaniach polimorfizmu DNA, iż jedna para chimer płciowych zdolna jest do reprodukcji potomstwa, z których każde będzie posiadało zróżnicowany genotyp, inny niż ten, który jest wypadkową ich biologicznych rodziców. Jest to możliwe ponieważ każde z biologicznych rodziców (chimer płciowych) uzyskano po iniekcji komórek pochodzących od dwudziestu dawców. Teoretycznie zatem ich gonady zdolne są do produkcji gamet nosicielei dwudziestu różnych genotypów dawców iniekowanych komórek. Praktyczną implikacją tego faktu jest możliwość rekonstrukcji bioróżnorodności populacji dawców komórek w oparciu na kojarzeniu zaledwie kilku chimer płciowych.

Opisane praktyczne wykorzystanie możliwości manipulacji komórkami embrionalnymi ptaków jest wynikiem realizowanej w ostatnich latach problematyki badawczej, która dotyczyła:

- doskonalenia metod produkcji chimer,
- poprawy przeżywalności zarodków chimer po iniekcji komórek dawców,
- metod identyfikacji chimer,
- zwiększenia stopnia chimeryzmu,
- metod transfekcji komórek BC i PGC,
- obserwacji fizjologicznych, genetycznych i produkcyjnych aspektów chimeryzmu, itd.

Dalsze badania z tego zakresu powinny zmierzać, jak się wydaje, z jednej strony do lepszego wykorzystania PGC w tworzeniu chimer płciowych, z drugiej zaś do opracowania praktycznych przesiewowych metod identyfikacji transfekowanych komórek oraz zapewnienia trwałej transfekcji komórek, w celu rutynowej produkcji ptaków transgenicznych lub bioreaktorów.

Interesujące ponadto, jak się wydaje, są możliwości obserwacji interakcji pomiędzy różnymi genotypami komórek dawców i biorców w organizmie chimery, a przede wszystkim ocena możliwości sterowania płcią ptaków. Tym bardziej, że udowodniono możliwość różnicowania się PGC w gametach biorców (39,40), nawet odmiennej płci i produkcję tą drogą funkcjonalnych gamet.

Niemożliwe do tej pory, badania nad mechanizmem wzajemnego oddziaływania egzo- i endogennych komórek w organizmie chimery, a tym bardziej jego wpływ na jej funkcje płciowe będą mogły być podjęte, ponieważ dysponuje się odpowiednio licznym materiałem badawczym, ponadto oznaczony został profil genetycznych ptaków dawców i biorców komórek embrionalnych (na podstawie polimorfizmu mikrosatelitarnych sekwencji DNA), a wreszcie opublikowano szybką, przyżyciową metodę oznaczania płci wczesnych zarodków kury (41).

Praca wykonana w ramach projektu 5 P06D 021 18, finansowanego przez KBN

Literatura

1. Eyal-Giladi H., Kochav S., (1976), *Develop. Biology*, 49, 321-337.
2. Bednarczyk M., (2000), *Przegląd Hodowlany*, 6, 37-39.
3. Marzyllo G., (1970), *Nature, Lond.*, 225, 72-73.
4. Petitte J. M. E., Clark G., Liu A., Verrinder Gibbins M., Etches R. J., (1990), *Development*, 108, 185-189.
5. Łakota P., (2001), *Przeżywalność i stopień chimeryzacji zarodków kurzych po iniekcji komórek blastodermalnych i pierwotnych komórek płciowych*, dysertacja doktorska, OBD IZ Zakrzewo k. Poznania.
6. Ginnsburg M., Eyal-Giladi H., (1986), *J. Embryol. Exp. Morph.*, 95, 53-71.
7. Carsience R. S., Clark M. E., Verrinder Gibbins A. M., Etches R. J., (1993), *Development*, 117, 669-675.
8. Naito M., Nirasawa K., Oishi T., (1992), *Br. Poult. Sci.*, 33, 449-453.
9. Kagami H., Clark M. E., Verrinder Gibbins A. M., Etches R. J., (1995), *Mol. Reprod. Dev.*, 42, 379-388.
10. Tarkowski A. K., Wróblewska J., (1967), *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 8, 155-180.
11. Le Dourian N. M., (1973), *Develop. Biology.*, 30, 217-222.
12. Yasuda Y., Tajima A., Fujimoto T., Kuwana T., (1992), *J. Reprod. Fert.*, 96, 521-528.
13. Ono T., Machida Y., (1999), *Comp. Biochem. Physiol., Part A* 122, 255-259.
14. Naito M., Sasaki E., Ohtake M., Sakurai M., (1994), *Mol. Reprod. Develop.*, 37, 167-171.
15. Ono T., Matsumoto T., Arisawa Y., (1998), *Anim.*, 47, 215-219.
16. Watanabe M., Kinutani M., Naito M., Ochi O., Takaschima Y., (1992), *Development*, 114, 331-338.
17. Maeda T., Clark M. E., Etches R. J., (1998), *Poultry Sci.*, 77, 905-907.
18. Pokorny P., (2002), *Animal Sci. Papers and Reports*, 20, 55-66.
19. Speksnijder G., Liu G., Baugh L. R., Harvey A. J., Ivorie R., (1998), *Plant & Animal Genome VI Conference, San Diego*, P380.
20. Thoraval P., Lasserre L., Coudert F., Dambrine G., (1994), *Poultry Sci.*, 73, 1897-1905.
21. Speksnijder G., Ivorie R., (2000), *Poultry Sci.*, 79, 1430-1433.
22. Ono T., Muto S., Mizutani M., Agata K., Mochii M., Kino K., Otsuka K., Ohta M., Yoshida M., Eguchi G., (1994), *J. Poul. Sci.*, 31, 119-129.
23. Naito M., Watanabe W., Kinutani M., Nirasawa K., Oishi T., (1991), *Br. Poultry Sci.*, 32, 79-86.
24. Bednarczyk M., Łakota P., Siwek M., (2000), *Poultry Science*, 79, 1823-1828.
25. Kino K. B., Pain B., Leibo M., Cochrans M., Clark M. E., Etches R. J., (1997), *Poultry Sci.*, 76, 753-760.
26. Vick L., Luke G., Simkiss K., (1993), *J. Reprod. Fert.*, 98(2), 637-641.
27. Bednarczyk M., Łakota P., Siwek M., Czekalski P., (2000), *Zeszyty Naukowe PTZ, Chów i Hodowla Drobiu*, 49, 214-215.
28. Siwek M., Bednarczyk M., Wężyk S., Cywa-Benko K., (1998), *Proc. 10th Europ. Poult. Conf. Jerusalem*, June 21-26, 115.
29. Sasaki E., Etches R. J., (2001), *Poultry Sci.*, 80, 161-171.
30. Brazolot C. L., Petitte J. N., Etches R. J., Gibbins A. M. V., (1991), *Mol. Reprod. Develop.*, 30, 304-312.
31. Muramatsu T., Mizutani Y., Ohmori Y., Okumura J., (1997), *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 230, 376-380.
32. Plucienniczak A., Wójcik E., (2000), *Wektory do otrzymywania kur transgenicznych. Zlecenie 50/79/99, Instytut Biotechnologii i Antybiotyków.*
33. Bednarczyk M., Sochanik A., Łakota P., Siwek M., (2000), *Zeszyty Naukowe PTZ, Chów i Hodowla Drobiu*, 49, 216-217.
34. Bednarczyk M., Plucienniczak G., Plucienniczak A., Łakota P., Sochanik A., Dłużniewska P., Grajewski B., (2003), *Folia Biol. (Kraków)* 51, (w druku).

35. Chelmońska B., Pokorny P., Wojciechowski A., (1997), *Animal Science Papers and Reports* 15(2), 73-84.
36. Cywa-Benko K., (2002), *Rocz. Nauk. Zootech. Rozprawy Habilitacyjne*, 15, 1-111.
37. Bednarczyk M., Łakota P., Słomski R., Pławski A., Lipiński D., Siemiński B., Lisowski M., Czekalski P., Grajewski B., Dłużniewska P., (2002), *Poultry Sci.*, 81 (w druku).
38. Bednarczyk M., Łakota P., Czekalski P., (2001), *Current Problems of Breeding, Health and Production of Poultry*, 36, Ceskie Budějovice, 6th-7th February.
39. Kagami H., Tagami T., Matsubara Y., Harami T., Hanada H., Maruyama K., Sakurai M., Kuwana T., Naito M., (1997), *Mol. Reprod. Dev.*, 48, 501-510.
40. Naito M., Sano A., Matsubara Y., Harumi T., Tagami T., Sakurai M., Kuwana T., (2001), *Reproduction*, 121, 547-552.
41. Clinton M., Haines L., Belloir B., McBride D., (2001), *British Poultry Sci.*, 42, 134-138.