

# Technologia uzyskiwania monogenetycznych bliźniąt u ssaków

*Maria Skrzyszowska*

*Zdzisław Smorąg*

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt

Instytut Zootechniki

Balice k. Krakowa

Rozwój technik niechirurgicznego pozyskiwania i przenoszenia zarodków przede wszystkim bydłych, zaowocował komercjalizacją tych zabiegów i powstaniem ośrodków przenoszenia zarodków, które w swojej ofercie proponują również techniki umożliwiające produkcję identycznych genetycznie bliźniąt.

Upowszechnienie tego sposobu uzyskiwania bliźniąt poprzedzone zostało szeregiem eksperymentów zarówno na zarodkach zwierząt laboratoryjnych jak i gospodarskich.

Celem pracy jest podsumowanie dotychczasowych badań nad uzyskiwaniem monogenetycznego potomstwa na bazie mikrochirurgicznego dzielenia zarodków, ze szczególnym uwzględnieniem czynników warunkujących efektywność metody.

Ponadto opisana zostanie opracowana przez nas nowa, alternatywna metoda uzyskiwania monogenetycznych bliźniąt u bydła oparta na zmodyfikowanej bisekcji.

Początki badań sięgają lat czterdziestych naszego wieku. Podejmowane wówczas próby dotyczyły określenia potencjału rozwojowego pojedynczych blastomerów pochodzących z wczesnych zarodków szurzych (15) i króliczych (18). Problemy te zostały szczegółowo zdiagnozowane i opracowane pod koniec lat pięćdziesiątych i w latach sześćdziesiątych przez Tarkowskiego i wsp. (25-27). Stworzyło to podstawy do przeprowadzenia intensywnych badań tak z zakresu embriologii eksperymentalnej jak i stosowanej, w tym także do opracowania procedur umożliwiających multiplikację zarodków metodami mikrochirurgicznymi. Z badań Tarkowskiego i wsp. wynikało, że istnieje możliwość rozwoju pojedynczych blastomerów z zarodków 2-komórkowych, blastomery izolowane bowiem z zarodków w późniejszych stadiach rozwojowych (4- lub 8-komórkowych) wykształcały w znacznym odsetku formy nieprawidłowe.

Willadsen (33) wykorzystał technikę izolacji blastomerów w celu uzyskania identycznych genetycznie wieloraczków u bydła i owiec. W ramach tej proce-

dury blastomery izolowane mechanicznie z zarodków 2-8-komórkowych umieszczano w zastępczych osłonkach przezroczystych, a następnie zatapiano w cylindrach agarowych. Cylindry umieszczano w jajowodzie pośredniej biocyrzyni do czasu osiągnięcia przez zarodki stadium moruli lub blastocysty. Po tym czasie wyplukiwano cylindry agarowe i uwalniano z nich zarodki. Stosując tę procedurę autorzy uzyskali monogenetyczne bliźnięta u obu wymienionych gatunków zwierząt gospodarskich. Pomimo zadowalającej efektywności po przeniesieniu manipulowanych zarodków do dróg rodnych zsynchronizowanych biocyrzyni (ok. 80% implantacji), wartość aplikacyjna metody była znikoma i w zasadzie nie wyszła poza stadium eksperymentalne. Przyczyną tego był skomplikowany sposób postępowania związany z koniecznością przynajmniej dwóch interwencji chirurgicznych w związku z wykorzystywaniem pośrednich biocyrzyni jako inkubatorów do hodowli nowo uformowanych zarodków.

Pisząc o technologii uzyskiwania identycznych genetycznie bliźnięt mamy na uwadze przede wszystkim techniki bisekcji zarodków, które w stosunkowo prosty sposób umożliwiają rozdzielenie zarodka na dwie części. W 1982 r. niezależnie od siebie Williams (35) i Ozil (17) opracowali skuteczną metodę dzielenia morul i blastocyst bydłecych. Posługując się mikronożem lub szklaną igłą umocowaną na ramieniu mikromanipulatora dokonywano przecięcia zarodka na dwie części, z których każda miała potencjalne szanse na normalny rozwój.

Wcześniej próby dzielenia zarodków owczych podejmowali Trounson i Moor (29). Zaowocowały one wprawdzie uzyskaniem potomstwa z „połówek” zarodków, nie stanowiło ono jednak monogenetycznej pary, gdyż uzyskane osobniki rozwijały się z różnych zarodków. Podobne próby wykonane kilka lat później przez Meinecke-Tillman (11) doprowadziły do uzyskania identycznych genetycznie bliźnięt u owiec. W Polsce pierwsze bliźnięta u owiec uzyskano w połowie lat osiemdziesiątych (24), a bydłące dwa lata później (19).

Stosując metodę bisekcji uzyskano monogenetyczne bliźnięta u różnych gatunków ssaków między innymi u myszy (13,14), kozy (30), świni (16) i konia (23). Większość prac z tego zakresu przeprowadzono jednak na zarodkach bydłecych (1,2,8,9,17).

Jakkolwiek bisekcja jest dość prostą i wydajną metodą multiplikacji zarodków i produkcji identycznych genetycznie bliźnięt, to jednak nie do końca jasne są jej praktyczne możliwości. Uzyskiwane rezultaty przenoszenia „połówek” zarodków do dróg rodnych zsynchronizowanych biocyrzyni bywają różnicowane i często są one bardzo niskie. Pozostaje zatem pytanie jakie czynniki mogą mieć na to wpływ? Rozważano szereg czynników ograniczających rozwój dzielonych zarodków (2,8). Z całą pewnością z punktu widzenia możliwości rozwojowych „połówek” wyjściowa jakość zarodka poddawanego bisekcji odgrywa istotną rolę. Dowiodły tego badania Brema (3) i Voelkela (31), z których wynikało, że zadowalające rezultaty można uzyskać jedynie po przeniesieniu „połówek” uzyskanych z zarodków ocenianych jako bardzo dobre (ponad 50%), podczas gdy efektywność przenoszenia „połówek” otrzymanych po bisekcji zarodków, o wątpliwym wyglądzie morfologicznym, kształtowała się na poziomie kilku procent.

Drugim ważnym kryterium przydatności zarodka do bisekcji jest jego wiek. W zasadzie bisekcji poddawane są zarodki w stadium późnej moruli oraz w stadium blastocysty, a zatem w tych stadiach, w których kompakcja blastomerów jest już mocno zaawansowana. Korzystniejsze wyniki przeżywania obserwuje się w przypadku „połówek” uzyskanych po bisekcji blastocyst w porównaniu z połówkami uzyskanymi po bisekcji morul (35). Właśnie zarodki w stadium blastocysty, jak się wydaje, są bardziej przydatne do tych zabiegów.

Wśród innych czynników rozważano także wpływ liczby przenoszonych połówek. Z obserwacji kilku autorów (9,10,17) wynikało bowiem, że poziom implantacji zależny był od tego, czy wprowadzano do dróg rodnych samicy pojedyncze połówki czy pary połówek. Niższe wyniki uzyskiwane po przeniesieniu pojedynczych połówek mogły być spowodowane m.in. niedostateczną masą komórkową, jaką dysponowała pojedyncza „połówka”, co w rezultacie sprawiło, że zarodek taki wysyłał zbyt słaby sygnał ciążyowy. Potwierdzały to badania dotyczące dzielenia zarodków na cztery części (32). W tym przypadku uzyskiwana efektywność była zdecydowanie niższa niż po przeniesieniu połówek. Trzeba jednak wziąć pod uwagę również ograniczone zdolności regulacyjne zarodków dysponujących drastycznie zredukowaną liczbą komórek. W kontekście tych rozważań interesujące były obserwacje Heymana i wsp. (5) dotyczące porównania efektywności przenoszenia „połówek” zarodków bydłęcych uzyskanych w wyniku bisekcji, całych zarodków oraz dwóch zarodków. Najwyższą efektywność uzyskali autorzy po przeniesieniu dwóch zarodków, co sugerowało zależność stopnia implantacji od ogólnej masy komórek wprowadzonych do dróg rodnych samicy. W związku z tym autorzy ci podjęli próby wzmocnienia wczesnego sygnału ciążyowego wprowadzając do dróg rodnych bioczyni dodatkową masę komórek trofoektodermalnych w postaci pęcherzyków trofoblastycznych wyprodukowanych z fragmentów trofoblastu kilkunastodniowego zarodka bydłęcego (6). Zabieg ten wpływał korzystnie na poziom implantacji zarodków o zredukowanej masie komórkowej. Badania z tego zakresu nie były jednak podejmowane przez innych autorów, zatem rolę pęcherzy trofoblastycznych jaką mogą pełnić w procesie implantacji „połówki” należy uznać za nie w pełni rozstrzygniętą.

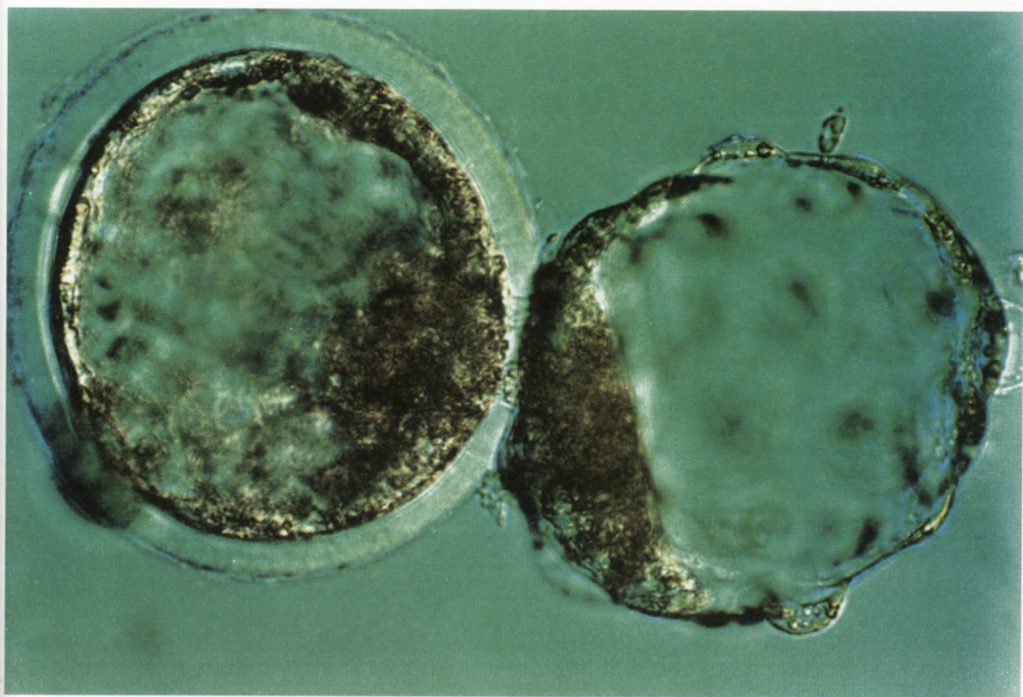
Wśród czynników mających wpływ na ostateczną efektywność bisekcji nie sposób pominąć faktu strat komórkowych ponoszonych w trakcie tego zabiegu. Liczba komórek, jaką dysponuje „połówka” zarodka, teoretycznie odpowiada połowie z całkowitej liczby komórek zarodka całego, w rzeczywistości jednak jest mniejsza o odsetek komórek niszczonej w trakcie mikrochirurgicznego cięcia zarodka. Według naszych szacunków straty komórkowe kształtują się na poziomie kilkunastu procent (20). Odsetek niszczonej komórek zależy od wielu czynników i jest uwarunkowany m.in. wiekiem zarodka. Najwyższy odsetek niszczonej komórek zanotowano podczas bisekcji zarodków w stadium wczesnej blastocysty. Odsetek ten był o kilka procent niższy w przypadku późnych blastocyst. Badania Chesné i wsp. (4), w których porównywano możliwości implantacyjne „połówek” z 8-, 9- i 10-dniowych zarodków owczych wykazały wyższą skuteczność przenoszenia połówek

z 10-dniowych zarodków. Dane te mogą pośrednio świadczyć o występowaniu mniejszych strat komórkowych w trakcie bisekcji zarodków dysponujących wyjściowo większą liczbą komórek. Rozpatrując problem strat komórkowych w dzielonych blastocystach należy uwzględnić jeszcze to, że straty dotyczą zarówno komórek trofoektodermalnych, jak i komórek węzła zarodkowego. Wiadomo, że komórki te pełnią różne funkcje w dalszym rozwoju zarodkowym. Szczególnie istotne znaczenie mogą mieć straty komórkowe w obrębie węzła zarodkowego. Dlatego bardzo ważna jest poprawność wykonania zabiegu bisekcji polegająca na tym, aby obie połówki dysponowały nie tylko zbliżoną liczbą komórek, ale zachowały także właściwe proporcje komórek trofoektodermalnych do komórek węzła zarodkowego porównywalne z występującymi w zarodku całym.

Opisana metoda jest metodą standardową. Wspomniano już, że została ona zaadaptowana przez niektóre ośrodki transplantacji zarodków u bydła do produkcji monozygotycznych bliźniąt.

Praktyczne wykorzystanie metody jest, jak już wspomniano, ograniczone obniżoną zdolnością implantacyjną „połówek” zarodków. Dlatego też wszelkie modyfikacje metody, które prowadziłyby do poprawy efektywności są dla praktycznego jej stosowania rozstrzygające. W rezultacie badań, jakie prowadziliśmy nad poprawą efektywności dzielenia zarodków w tym zakresie, została opracowana nowa technologia uzyskiwania monogenetycznych bliźniąt w oparciu na zmodyfikowanej metodzie bisekcji.

Proponowany nowy sposób bisekcji pozwala na znaczne zmniejszenie strat komórkowych w porównaniu z tymi, które powstają w trakcie standardowej bisekcji, redukuje je bowiem do poziomu kilku komórek. Istotą metody jest prowokowanie specyficznego sposobu wylęgania się zarodków, w trakcie którego dokonuje się zabiegu bisekcji. Jest to możliwe do osiągnięcia po wcześniejszym dokonaniu perforacji w osłonce przejrzystej zarodka w stadium blastocysty. Około połowy z perforowanych blastocyst w warunkach hodowli *in vitro* ekspanduje przez otwór w osłonce przejrzystej. Na pewnym etapie tego procesu połowa wylęgającego się zarodka pozostaje ciągle w osłonce przejrzystej, a druga jest już poza osłonką przejrzystą. Wylęgający się według tego schematu zarodek przypomina kształtem postać „ósemki” (fot. 1). Obie jego części połączone są wówczas jedynie bardzo wąskim mostkiem komórkowym. Wtedy dokonuje się zabiegu przecięcia mostka komórkowego. Przeprowadza się to manualnie lub przy wykorzystaniu mikromanipulatora używając do tego celu szklanej igły bądź mikroostrza, podobnie jak w przypadku bisekcji konwencjonalnej. Dokonując cięcia w miejscu dużego przewężenia zarodka, redukujemy do minimum odsetek niszczonej komórek. Opisana metoda jest zatem prawie nieinwazyjną techniką dzielenia zarodków. Jej skuteczność jest uwarunkowana szeregiem czynników, które w znacznym stopniu zostały już rozpoznane. Pierwszym istotnym czynnikiem jest stadium rozwoju zarodka. Z naszych badań wynika, że najbardziej przydatnym do tych manipulacji jest stadium późnej blastocysty. Odsetek bowiem późnych blastocyst wylęgających się według oczekiwanego sposobu, tj. tworzących na pewnym etapie wylęgania figurę przypominającą kształtem „ósemkę”, był zdecydowanie wyższy niż w przy-



Fot. 1. Specyficzny sposób wylęgania perforowanych blastocyst (formowanie figury w kształcie „ósemki” przy ekwiwalentnym rozdzieleniu komórek wężła zarodkowego i trofoblastu w obu połówkach).



Fot. 2. Pary monogenetycznych cieląt uzyskanych po przenoszeniu połówek zarodków otrzymanych w wyniku zmodyfikowanej bisekcji.

padku zarodków w stadium średniej czy ekspandującej blastocysty. Wydaje się, że jest to spowodowane zmieniającymi się wraz ze wzrostem zarodka parametrami fizycznymi osłonki przejrzystej. Średnią blastocystę otacza jeszcze stosunkowo gruba osłonka przejrzysta, która może stanowić trudną do pokonania barierę dla wylęgającego się zarodka, zwłaszcza jeśli perforacja w osłonce przejrzystej ma niewielką średnicę. W przypadku natomiast ekspandującej blastocysty mamy do czynienia z wyraźnie cieńszą osłonką przejrzystą wskutek rozpierania jej przez rosnący zarodek i wzrastające ciśnienie płynu w jamie blastocysty. W tym stadium zatem naruszenia integralności osłonki przez wprowadzenie mikroinstrumentu służącego do perforacji osłonki przejrzystej spowodować może jej rozerwanie na znacznie większym odcinku niż wielkość zamierzonej perforacji. Rezultatem tego jest opuszczanie osłonki przejrzystej przez zarodek bez przejściowego formowania figury w kształcie ósemki. Z obserwacji autorów wynika, że zarodki w stadium późnej blastocysty otoczone osłonką przejrzystą o optymalnej grubości, a ponadto z wyraźnie zarysowanym obszarem węzła zarodkowego, są najbardziej przydatne do tego rodzaju manipulacji (21).

Drugim niezwykle istotnym czynnikiem warunkującym efektywność metody jest lokalizacja perforacji, która decyduje o równomiernym rozdzieleniu komórek zarówno węzła zarodkowego jak i trofoektodermy podczas prowokowanego wylęgania blastocysty. Dokonanie perforacji osłonki w miejscu leżącym nad komórkami trofoektodermalnymi w pewnej niewielkiej odległości od komórek węzła zarodkowego prowokuje szybszą ekspansję komórek trofoektodermalnych i nieco wolniejszą komórek węzła zarodkowego, co pozwala na bardziej równomierne rozmieszczenie obu typów komórek w tworzącej się w trakcie wylęgania figurze w kształcie „ósemki”.

Stosowanie różnych technik perforacji osłonki przejrzystej, np. przez nakłucie mikropipetą lub nacięcie szklaną igłą nie miało większego wpływu na efekty zabiegu (22), chociaż w próbach biologicznych zaobserwowano niewielką różnicę na korzyść techniki nacinania osłonki w porównaniu z nakłuwaniem. Obserwacje te przeprowadzono jednak na stosunkowo małym materiale zatem nie możemy sformułować jeszcze ostatecznych wniosków.

Rozstrzygającym kryterium oceny wartości opracowanej metody jest zdolność uzyskanych „połówek” do pełnego rozwoju w warunkach *in vivo*. Dotychczasowe rezultaty świadczą nie tylko o możliwości pełnego rozwoju *in vivo* uzyskanych przy zastosowaniu tej metody połówek zarodków, ale o możliwości rozwoju obydwu „połówek” równocześnie (tab. 1). W efekcie uzyskaliśmy już na tej drodze wiele par monogenetycznych bliźniąt. Przeprowadzone przez nas do tej pory badania wskazują, jak się wydaje, na większą efektywność naszej metody w porównaniu z efektywnością metody standardowej. Badania te przeprowadzone zostały na zarodkach uzyskanych *in vivo*. Należałoby jednak zauważyć, że ta nowa metoda dzielenia zarodków powinna być postrzegana jako element kompleksowej technologii dojrzewania i zapłodnienia pozaustrojowego u bydła. W warunkach bowiem kilkudniowej hodowli *in vitro* (ok. 7 dni), niezbędnej do wyprodukowania zarodków w stadium blastocysty, wydłużenie czasu hodowli o kilkanaście czy kilkadziesiąt godzin (po dokonaniu perforacji

osłonki przejrzystej) nie komplikuje w zasadniczy sposób procedury. Wiadomo jednak, że zarodki uzyskane w rezultacie zapłodnienia *in vitro* dysponują mniejszą liczbą komórek w porównaniu z zarodkami uzyskiwanymi od superowulowanych dawczyń (7), co może czynić ten materiał mniej przydatny do zabiegu bisekcji. Wydaje się jednak, że stosowane obecnie nowe metody współhodowli zarodków z komórkami somatycznymi, roszą uzasadnione nadzieje na poprawę jakości blastocyst produkowanych metodami *in vitro*, co znajduje odzwierciedlenie w liczbie komórek blastocysty porównywalnej z liczbą komórek w blastocystach uzyskiwanych od samicy-dawczyni. Szczególnie ważne jednak w przypadku wykorzystywania do bisekcji zarodków wyprodukowanych metodami *in vitro* jest to, aby uzyskane „połówki” zostały przeniesione do dróg rodnych biorczyń w jak najkrótszym czasie po zabiegu dzielenia. Przetrzywanie bowiem połówek zarodków w suboptymalnych warunkach powoduje ograniczenia ich szansy na pełny rozwój, a tym samym zmniejsza możliwość uzyskania identycznych genetycznie bliźniąt.

TABELA 1  
WYNIKI PRZENOSZENIA POŁÓWEK ZARODKÓW BYDŁĘCYCH  
WYPRODUKOWANYCH METODĄ ZMODYFIKOWANEJ BISEKCJI

Liczba blastocyst	Technika perforacji	Liczba biorczyń/ liczba transplantowanych połówek	Liczba cielnych biorczyń	Liczba wycielonych/ liczba cieląt
5	nakłucie	8/1 połówki	4	4/4*
		1/2 połówki	1	1/2
30	nacięcie	4/1 połówki	12	12/14**
		28/2 połówki		
13	kontrola	13/2 połówki	2	2/3*

\* — w tym 1 para monogenetycznych bliźniąt,

\*\* — 2 pary monogenetycznych bliźniąt.

Dotychczas uzyskane wyniki przenoszenia połówek zarodków bydłych dają podstawy do oczekiwań, że opracowana metoda może być rozważana jako alternatywa dla standardowej bisekcji. To czy stanie się metodą wykorzystywaną praktycznie do produkcji identycznych genetycznie bliźniąt będzie zależało od oceny jej efektywności przeprowadzonej na większym materiale.

Korzyści wynikające z produkcji identycznych genetycznie zwierząt są wymierne zarówno w aspekcie praktycznym, jak i badawczym, zwłaszcza w eksperymentach embriologicznych i fizjologicznych przy szczególnym uwzględnieniu prac o charakterze żywieniowym. Włączenie efektywnej metody bisekcji zarodków do programu hodowlanego MOET, który w odniesieniu do bydła odgrywa ważną rolę w przyspieszeniu postępu hodowlanego, może zwiększyć jego możliwości. Stwarza to m.in. lepszą możliwość określenia płci zarodka poprzez pobieranie komórek do analizy molekularnej w trakcie przeprowadzania zabiegu dzielenia.



## Literatura

1. Baker R. D., Shea B. F., (1985), *Theriogenology*, 23(1), 3-12.
2. Bredbacka P., (1995), *Theriogenology*, 44, 159-166.
3. Brem G., Kruff B., Szilvassy B., Tenhumberg H., (1984), *Theriogenology*, 21(1), 225.
4. Chesné P., Colas G., Cognié Y., Guerin, Sévellec Claude, (1987), *Theriogenology*, 27(5), 751-757.
5. Heyman Y., (1985), *Theriogenology*, 23(1), 63-75.
6. Heyman Y., Chesné P., Chupin D., Ménézo Y., (1987), *Theriogenology*, 27(3), 477-484.
7. Heyman Y., Degrolard J., Adenot P., Chesné P., Fléchon B., Renard J. P., Fléchon J. E., (1995), *Reprod. Nutr. Dev.*, 35, 713-723.
8. Kippax I. S., Christie W. B., Rowan T. G., (1991), *Theriogenology*, 35, 25-35.
9. Lambeth V. A., Looney C. R., Voelkel S. A., Jackson D. A., Hill K. G., Godke R. A., (1983), *Theriogenology*, 20(1), 85-95.
10. Massip A., van der Zwalmen P., Ectors F., (1985), *Vlaams Diergeneeskunding Tijdschrift*, 55(2), 63-74.
11. Meinecke-Tillmann S., (1980), *Umschau S*, 248-249.
12. Mullen R. J., Whitten W. K., Carter S. C., (1970), in: *Annual Report of the Jackson Laboratory*, Bar Harbor, Maine, 67-68.
13. Nagashima H., Matsui K., Sawasaki T., Kano Y., (1984), *J. Rep. Fert.*, 70, 357-362.
14. Nagashima H., Kafoh Y., Shibata K., Ogawa S., (1987), *Theriogenology*, 27(1), 262.
15. Nicholas J. S., Hall S.V., (1942), *J. Exp. Zool.*, 90, 441-459.
16. Ozil J. P., Heymann Y., Renard J. P., (1982), *Vet. Rec.*, 110, 126-127.
17. Ozil J. P., (1983), *J. Rep. Fert.*, 69, 463-468.
18. Seidel F., (1952), *Naturwissenschaften*, 39, 306.
19. Skrzyszowska M., Znaniecki R., Bychawski S., Smorąg Z., (1988), *Medycyna Wet.*, 7, 412-414.
20. Skrzyszowska M., Smorąg Z., (1989), *Theriogenology*, 32(1), 115-122.
21. Skrzyszowska M., Smorąg Z., Kątska L., (1997), *Theriogenology*, 48(4), 551-557.
22. Skrzyszowska i wsp. (dane nie publikowane).
23. Slade N. P., Williams T. J., Squires E. L., Seidel G. E. Jr., (1984), 10<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem., Urbana, II, 241.
24. Smorąg Z., Ozil J. P., Modliński J. A., Wierzchoś E., Babušík P., Skrzyszowska M., (1985), *Medycyna Wet.*, 10, 627-629.
25. Tarkowski A. K., (1959a), *Nature*, 184, 1286-1287.
26. Tarkowski A. K., (1959b), *Acta Theriol.*, B, 191-267.
27. Tarkowski A. K., Wróblewska J., (1967), *J. Embryol. Exp. Morph.* 18, 1, 155-180.
28. Theron M. C., Renard J. P., Crozet M., (1986), *Mat. Symp. Cryobiology*, Lyon, p.r. 1.
29. Trounson A. O., Moore N. W., (1974), *J. Reprod. Fert.*, 41, 97-105.
30. Tsunoda Y., Waksou M., Yasui T., Sugie T., (1984), 10<sup>th</sup> Int. Congr. Anim. Reprod. Art. Insem., Urbana, II, 249.
31. Voelkel S. A., Amborski G. F., Hill K. G., Godke R. A., (1985), *Theriogenology*, 24(3), 271-281.
32. Voelkel S. A., Rorie R. V., McFarland C. W., Godke R. A., (1986), *Theriogenology*, 25(1), 207.
33. Willadsen S. M., (1980), *J. Reprod. Fert.*, 59, 357-362.
34. Willadsen S. M., Polge C., (1981), *Vet. Rec.*, 108, 211-213.
35. Williams T. J., Elsdon R. P., Seidel G. E. Jr., (1982), *Theriogenology*, 17(1), 144 abstr.
36. Williams T. J., Moore L., (1988), *Theriogenology*, 29(2), 477-484.

## Monogenetic twin production technique in mammals

### Summary

The development of non-surgical methods of embryo collection and transfer, primarily in cattle, has led to the commercialization of these techniques, including the production of genetically identical twins. The aim of this paper is to review the progress of the studies on the production of monogenetic progeny using microsurgical bisection of embryos, with a special emphasis put on factors affecting the efficiency of this method. We have also described our new alternative method of monogenetic twin production in cattle based on modified bisection of specifically hatching blastocysts, whose zona pellucida had been perforated.

### Key words:

blastocyst, zona-perforation, hatching, bisection, monogenetic twin.

### *Adres do korespondencji:*

Maria Skrzyszowska, Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa.