



Wykorzystanie metod biotechnologii rozrodu w zachowaniu bioróżnorodności zwierząt

Barbara Gajda, Zdzisław Smorąg

Dział Biotechnologii Rozrodu Zwierząt, Instytut Zootechniki,
Państwowy Instytut Badawczy, Balice k. Krakowa

Application of reproduction biotechnology methods in animal biodiversity conservation

Summary

This article presents the potential and prospects for the use of selected reproduction biotechnology methods in animal biodiversity conservation programs. The first part focuses on biotechnological methods related to male reproduction such as artificial insemination, semen cryoconservation, sexing and spermatozoa sorting. The second part discusses biotechnological methods related to female reproduction such as superovulation, *in vitro* production and transfer of embryos, cryoconservation of oocytes and embryos, embryo sexing, cloning and transgenesis.

Key words:

biodiversity, biotechnology, reproduction, male, female.

Adres do korespondencji

Barbara Gajda,
Dział Biotechnologii
Rozrodu Zwierząt,
Instytut Zootechniki,
Państwowy Instytut
Badawczy,
32-083 Balice k. Krakowa;
e-mail:
bgajda@izoo.krakow.pl

biotechnologia

4 (79) 55–65 2007

1. Wstęp

Bioróżnorodność to zróżnicowanie wszystkich żywych organizmów występujących na Ziemi w ekosystemach lądowych, morskich i słodkowodnych, oraz w zespołach ekologicznych, których są częścią (1). Nie ma jednak ogólnie przyjętej definicji bioróżnorodności, nie ma też jednomyślności w kwestii oceny zmian bioróżnorodności. Współcześnie liczba gatunków zwierząt, roślin i mikroorganizmów wynosi prawdopodobnie ok. 10 milionów, a spośród nich znanych jest jedynie ok. 1,7 miliona.

Z jednej strony znanych jest prawie 40 tysięcy gatunków bezkręgowców i 250 tysięcy gatunków roślin wyższych, a z drugiej istnieje prawdopodobnie przeszło milion gatunków grzybów, kilka milionów owadów, spośród których zidentyfikowanych jest jedynie kilka procent.

Według organizacji ekologicznej World Conservation Union od 1500 r. na świecie wyginęło ok. 800 gatunków zwierząt. Według World Watch List for Domestic Animal Diversity skatalogowanych zostało 2719 ras zwierząt gospodarskich, spośród nich liczebność populacji jest znana w 1433 rasach. Z tej liczby 390 ras (27%) jest obecnie zagrożonych wyginięciem. Uważa się, że około 5% tych ras znika w ciągu roku, oznacza to, że przeciętnie co tydzień ginie na świecie jedna rasa zwierząt gospodarskich. W okresie ostatnich kilkudziesięciu lat na świecie wyginęło już około 620 ras zwierząt, głównie w Europie i na terenach byłego ZSRR. Dramatyczna jest również sytuacja wielu wolno żyjących gatunków ssaków (2).

Zachowanie bioróżnorodności może być mierzone poprzez stan poszczególnych gatunków, grup gatunków, bądź malejącą liczbę organizmów. Głównymi zagrożeniami bioróżnorodności są w pierwszej kolejności zmiany środowiska (głównie przez powiększanie obszarów przeznaczonych pod uprawę oraz budowę miast i dróg), a po drugie wprowadzanie do środowiska gatunków preferowanych przez człowieka. Samo środowisko może być, jak wiadomo, niszczone zarówno przez człowieka, jak i naturę.

Wyginięcie gatunku na Ziemi jest nieodwracalną stratą w bioróżnorodności, znika bowiem gatunek i kombinacja genów w nim zawarta. Tworzy się zatem programy ochrony gatunków zagrożonych wyginięciem. Ochrona bioróżnorodności może być realizowana metodami *in situ*, w sposób mniej lub bardziej naturalny, lub metodami *ex situ* w celowo tworzonych ośrodkach o zdefiniowanych wymaganiach, gdzie w pewnym zakresie wykorzystywane są metody biotechnologii rozrodu.

W artykule przedstawiono wybrane metody biotechnologii rozrodu zwierząt, które mogą lub będą mogły być w przyszłości, po spełnieniu określonych warunków, wykorzystane w zachowaniu bioróżnorodności zwierząt. Metody te można podzielić na związane z rozrodem samców oraz samic.

2. Metody biotechnologiczne związane z rozrodem samców

Do metod biotechnologicznych związanych z rozrodem samców należą: sztuczna inseminacja, kriokonserwacja nasienia, oznaczanie płci i sortownie plemników.

2.1. Sztuczna inseminacja i kriokonserwacja nasienia

Metodą pozwalającą lepiej wykorzystać potencjał rozrodczy samców jest sztuczne unasienianie, a czynnikiem sprzyjającym praktycznemu wykorzystaniu metody jest możliwość zamrażania plemników większości gatunków ssaków w temperatu-

rze ciekłego azotu. Spośród ponad 50 gatunków zwierząt, których plemniki dotychczas zamrożono, nasienie buhaja okazało się najbardziej podatne na kriokonserwację, dzięki temu m.in. zakres stosowania sztucznej inseminacji bydła jest największy i obejmuje ok. $\frac{3}{4}$ światowego pogłowia. Skala stosowania sztucznego unasieniania u pozostałych gatunków zwierząt gospodarskich, tj. owiec, świń, koni, a także królików jest nieporównanie mniejsza. Dzieje się tak zarówno z powodu istniejących wciąż trudności związanych z konserwacją nasienia, jak też z powodu stosunkowo niewielkiej wydajności rozplodowej samców tych gatunków.

Sztuczne unasienianie odegrało i odgrywa, zwłaszcza w odniesieniu do bydła i świń, bardzo dużą rolę w genetycznym doskonaleniu zwierząt. Szacuje się, że w ciągu ostatnich 30 lat, dzięki sztuczному unasienianiu, nastąpił dwukrotny wzrost wydajności mlecznej.

W hodowli świń, pomimo pewnych możliwości konserwacji nasienia knura w stanie zamrożonym, użycie jego w praktyce jest bardzo ograniczone. Mrożone nasienie zostało wprowadzone na niewielką skalę do sztucznego unasieniania loch głównie w Stanach Zjednoczonych. Połowa produkcji nasienia mrożonego w USA przeznaczona jest na eksport. W kilku innych krajach metoda ta służy głównie jako sposób zabezpieczenia cennego materiału genetycznego. W skali światowej użycie nasienia mrożonego knurów nie przekracza 1-2%.

Próby długotrwałej konserwacji nasienia ogiera podejmowano już w latach pięćdziesiątych XX w. Pierwsze źrebięta po inseminacji klaczy nasieniem mrożonym urodziły się w Japonii w 1964 r. (3). Wkrótce potem nastąpił rozwój zainteresowania inseminacją, szczególnie wśród hodowców koni sportowych. Nasienie ogierów okazało się jednak bardziej wrażliwe na proces zamrażania-rozmrażania niż nasienie buhajów. Ponadto niektóre związki hodowlane nie zaakceptowały w pełni tej metody rozrodu. Z tych i innych powodów inseminacja koni nie jest tak powszechnie stosowana jak to ma miejsce w hodowli bydła. Niemniej jednak w takich krajach jak: USA, Finlandia, Niemcy, Francja, Holandia, Belgia, unasienianych jest około 50-90% klaczy, w tym 1% nasieniem mrożonym.

Pierwsze próby mrożenia nasienia ogiera w Polsce zostały zapoczątkowane dzięki inicjatywie profesora Władysława Bielańskiego. W wyniku tych prób pod koniec lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku urodziło się w Polsce pierwsze źrebię po inseminacji nasieniem mrożonym (4).

Metody sztucznej inseminacji i kriokonserwacji nasienia stosowane od dziesiątków lat w hodowli i rozrodzie zwierząt gospodarskich są i będą z pewnością nadal wykorzystywane w zachowaniu bioróżnorodności zwierząt.

2.2. Oznaczanie płci i sortowanie plemników

Pewne znaczenie w realizacji programów zachowania bioróżnorodności zwierząt metodą *in situ* może mieć regulacja płci potomstwa. Najlepszym rozwiąza-

niem problemu regulacji płci jest seksowanie plemników na drodze segregacji nasienia na frakcję „męską” i „żeńską”. Od połowy lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku badania te koncentrują się na wykorzystaniu do tego celu cytometrii przepływowej. W metodzie tej wykorzystuje się różnice w zawartości DNA wynoszące od 3 do 4%, jakie występują między plemnikami niosącymi chromosom X i Y (5).

W chwili obecnej seksowane nasienie buhaja jest już komercyjnie dostępne w niektórych krajach. Prace nad seksowaniem nasienia buhajów w Instytucie Zootechniki podjęto w 2003 r., a w ich wyniku urodziło się w pierwsze cielę po inseminacji seksowanym nasieniem (6). W bieżącym roku rozpoczęto również próby seksowania nasienia ogiera.

Technika seksowania w odniesieniu do nasienia buhaja osiągnęła poziom, dzięki któremu przy spełnieniu określonych warunków może zapewnić akceptowaną z praktycznego punktu widzenia efektywność. Zachodzi zatem pytanie czy i w jaki sposób technika ta może być wykorzystana do zachowania bioróżnorodności zwierząt?

Wiadomo, że główną przyczyną redukcji bioróżnorodności populacji zwierząt gospodarskich jest wypieranie ras zwierząt mniej wydajnych przez rasy zwierząt bardziej atrakcyjnych z hodowlanego i ekonomicznego punktu widzenia. Hodowla cennych dla zachowania bioróżnorodności, lecz mniej wydajnych ras nie wytrzymuje kryteriów rynkowych. Sytuację tę mogłoby w pewnym stopniu zmienić na lepsze wykorzystanie możliwości, jakie stwarza regulacja płci zwierząt poprzez użycie seksowanego nasienia. Dotyczy to zwłaszcza zachowawczych hodowli ras bydła mlecznego. Dzięki seksowanemu nasieniu proporcja płci rodzącego się potomstwa mogłaby przesunąć się na korzyść samic, powodując tym samym poprawę wskaźników ekonomicznych takiej hodowli.

3. Metody biotechnologiczne związane z rozrodem samic

Do metod biotechnologicznych związanych z rozrodem samic należą: superowulacja, pozaustrojowe uzyskiwanie i przenoszenie zarodków, kriokonserwacja oocytów i zarodków, oznaczanie płci zarodków, klonowanie, transgeneza.

3.1. Superowulacja, pozaustrojowe uzyskiwanie i przenoszenie zarodków

Osiągnięcia endokrynologii rozrodu i embriologii stosowanej stworzyły podstawy lepszego wykorzystania potencjału rozrodczego samic umożliwiając dzięki superowulacji, zapłodnieniu *in vitro* i przenoszeniu zarodków sterowanie procesami rozrodczymi samic w kierunku zwiększenia ich wydajności rozrodczej i przyspieszenia postępu hodowlanego.

Metoda superowulacji stanowi podstawowe i niezbędne ogniwo w programie transplantacji zarodków. Aby metoda transplantacji zarodków spełniła swoje zada-

nie, samica-dawczyni powinna wyprodukować więcej komórek jajowych, niż to ma miejsce w normalnym cyklu rujowym. Do wywoływania superowulacji u takich zwierząt gospodarskich jak krowy, owce, kozy, świnie czy króliki z powodzeniem używane są gonadotropiny przysadkowe (FSH) lub pozaprzysadkowe (PMSG). Główne czynniki wpływające na efekty superowulacji to: rodzaj i ilość podawanych hormonów gonadotropowych, metoda superowulacji, rasa, wiek i żywienie zwierząt, pora roku, sezon rozrodczy.

Transplantacja zarodków znalazła zastosowanie zarówno w badaniach naukowych jak i w nowoczesnej hodowli. Technika transplantacji zarodków u bydła stanowi już narzędzie praktycznego oddziaływania na hodowlę tego gatunku.

Superowulacja, jak już wcześniej zaznaczono, pozwala na uzyskanie zwielokrotnionej liczby zarodków w jednym cyklu rujowym. Jednakże możliwości tej metody nie są w pełni satysfakcjonujące. Stąd też zainteresowanie alternatywnymi do superowulacji metodami uzyskiwania zarodków, do których należy pozaustrojowe uzyskiwanie zarodków. Uzyskiwanie zarodków ssaków w warunkach *in vitro* składa się z 3 podstawowych etapów obejmujących: uzyskiwanie i dojrzewanie oocytów *in vitro*, zapłodnienie pozaustrojowe i hodowlę zygot do stadium blastocysty. Procedury te są gatunkowo specyficzne i muszą być opracowywane oddzielnie dla każdego gatunku. Istnieje wiele czynników wpływających na efektywność zapłodnienia pozaustrojowego, z których ważniejsze to: gatunek zwierzęcia, jakość i dojrzałość oocytów, zdolność zapładniająca kapacytowanych plemników i ich koncentracja, czas wspólnej inkubacji gamet, temperatura zapłodnienia (7). Stosując metody pozaustrojowej produkcji zarodków uzyskano potomstwo u przeszło 20 gatunków ssaków. Osiągnięty dotychczas stopień zaawansowania w opracowywaniu technologii u poszczególnych gatunków jest znacznie zróżnicowany (7). U bydła, zanotowano w ostatnich latach znaczny postęp w opanowywaniu metod pozaustrojowego uzyskiwania zarodków i dzięki temu metoda ta jest już wykorzystywana w praktyce. Przyczyniła się też do tego możliwość przyżyciowego wielokrotnego uzyskiwania oocytów z jajnika tej samej krowy pod kontrolą USG (metoda OPU, ang. *ovum pick up*). W 1999 r. w Instytucie Zootechniki uzyskano pierwsze cielę urodzone w wyniku transplantacji zarodka przy wykorzystaniu kompleksowej metody pozaustrojowego i przyżyciowego uzyskiwania oocytu metodą OPU (8). Ocenia się, że metoda ta może być od 2 do 3 razy bardziej efektywna od superowulacji.

3.2. Kriokonserwacja oocytów i zarodków

Ważną z punktu widzenia zachowania bioróżnorodności jest możliwość kriokonserwacji zarodków oraz możliwość ich przechowywania przez długi czas. Należy tutaj postawić pytanie jak długi? Z kriobiologicznego punktu widzenia w temperaturze poniżej punktu eutektycznego, tj. od -65 do -75°C ustają wszystkie procesy związane z ruchem cząsteczek. Jedynym powodem zmian przechowywanego w niskich tempera-

turach materiału biologicznego mogłyby być zmiany wynikające z oddziaływania promieniowania naturalnego. Stwierdzono jednak, że negatywne skutki tego oddziaływania mogłyby wystąpić dopiero po upływie kilkudziesięciu tysięcy lat (9). Czas przechowywania materiału biologicznego w ciekłym azocie jest zatem praktycznie nieograniczony i nie ma negatywnego wpływu na zachowanie jego żywotności.

W programach zachowania bioróżnorodności kriokonserwacja materiału genetycznego może być wykorzystywana do następujących celów:

- jako metoda pomocnicza w utrzymywaniu populacji zwierząt chronionych żyjących na wolności,
- rekonstrukcji ras – w przypadku ich zanikania lub istotnej redukcji liczby zwierząt w danej rasie,
- tworzenia nowych linii lub ras – w przypadku ich zanikania (wygasania).

Jaki jest obecny stan zaawansowania metod kriokonserwacji oocytów i zarodków ssaków? Od czasu uzyskania potomstwa myszy po transplantacji zamrożonych zarodków upłynęło już ponad 30 lat, nadal jednak wiele problemów kriokonserwacji oocytów i zarodków ssaków nie udało się rozwiązać (10). Wciąż nie w pełni zadowalający poziom osiągnęła kriokonserwacja zarodków niektórych gatunków ssaków, na przykład świni, a w obrębie tego samego gatunku często bardzo zróżnicowana jest podatność na kriokonserwację zarodków znajdujących się we wcześniejszych stadiach rozwoju (11). Oddzielnym problemem jest kriokonserwacja oocytów ssaków. Mimo zanotowanego w ostatnich latach postępu (12), kriokonserwacja oocytów ssaków wciąż nie jest problemem rozwiązany w stopniu umożliwiającym jej praktyczne wykorzystanie (10).

W ostatnich kilkunastu latach rozwijana jest intensywnie witrifikacja jako metoda kriokonserwacji oocytów i zarodków (13-15). Stwarza ona nowe możliwości kriokonserwacji, ale jednocześnie posiada ograniczenia, które nie występowały w przypadku stosowania konwencjonalnych metod zamrażania. W metodzie tej zestalenie płynów odbywa się nie na drodze krystalizacji, ale poprzez bardzo szybki wzrost lepkości w trakcie schładzania. Metoda stanowi duże uproszczenie w stosunku do konwencjonalnych sposobów zamrażania i z powodzeniem może być zastosowana w warunkach terenowych. Rozpatrując jej wykorzystanie w kontekście realizacji programów bioróżnorodności należy to ocenić jako dużą zaletę.

Efektywność kriokonserwacji zarodków zależy od wielu czynników, z których ważniejsze to: gatunek, stan fizjologiczny i stadium rozwoju zarodka, jakość zarodka, metoda kriokonserwacji oraz rodzaj użytego związku osłaniającego. Generalnie, zarodki w stadium bardziej zaawansowanym charakteryzują się większą podatnością na kriokonserwację, zaś optymalnym stadium kriokonserwowanego zarodka jest morula-wczesna blastocysta.

Efektom prac nad kriokonserwacją zarodków zwierząt gospodarskich prowadzonych w Instytucie Zootechniki było m.in. urodzenie się w 1988 r. pierwszych w świecie jagniąt (16) oraz pierwszego w Polsce cielęcia (17), a przed dwoma laty także prosiąt po przeniesieniu witrifikowanych zarodków (18).

W ramach projektów zachowania ras rodzimych w Banku Materiałów Genetycznych Instytutu Zootechniki zgromadzono nasienie i zarodki bydła rasy polskiej czerwonej, owiec rasy: świniarka, olkuska, górską, romanowską, wrzosówką oraz wyselekcjonowanych pod względem wybitnych cech użytkowych i hodowlanych królików rasy: białej nowozelandzkiej, czerwonej nowozelandzkiej, białej duńskiej, czarnej alaski, białej termondzkiej i szynszyla dużego (19).

Problematyką wykorzystania kriokonserwacji izolowanego materiału genetycznego w programach zachowania bioróżnorodności w Europie zajmuje się grupa specjalistów z różnych krajów prowadząc prace w ramach organizacji Europejskich Zasobów Genetycznych Zwierząt Gospodarskich (ERFP) będącej częścią światowej sieci Genetycznych Zasobów Zwierzęcych (AnGR) przy FAO. Rezultatem dotychczasowych wysiłków tej grupy jest przygotowanie opracowania pt. *Guidelines for Constitution of National Cryopreservation Programmes for Farm Animals. European Regional Focal Point For Animal Genetic Resources* (20).

3.3. Oznaczanie płci zarodków

Możliwość praktycznego znaczenia stosowania metod regulacji płci w programach zachowania bioróżnorodności została już wcześniej omówiona, podczas prezentacji metody seksowania plemników. Jest oczywiste, że możliwość sterowania płcią na poziomie plemników jest z praktycznego punktu widzenia o wiele ważniejsza niż sama tylko możliwość wyboru zarodków o określonej płci. Mimo bowiem znacznie większych możliwości uzyskiwania zarodków zwierząt gospodarskich, a zwłaszcza bydła, dzięki metodom superowulacji oraz zapłodnieniu *in vitro*, wyprodukowanie jednego zarodka wiąże się wciąż ze znacznymi kosztami.

Istniejąca obecnie metoda molekularna oznaczania płci zarodków polega na identyfikacji odcinka DNA, specyficznego dla chromosomu Y, przy użyciu reakcji PCR (21). Zaletą tej metody jest możliwość użycia bardzo małych ilości materiału genetycznego, teoretycznie wystarczy 1 komórka do oznaczenia płci zarodka. W próbach, w których DNA pochodzi od osobnika płci męskiej widoczny jest w świetle UV fragment DNA w postaci prążka o długości 301 par zasad. W próbach, w których DNA pochodzi od osobnika żeńskiego brak jest prążka na tej długości. Metoda PCR umożliwia oznaczanie płci zarodków w stadium od 2 komórek do wylęgłej blastocysty (22). Metody molekularne pozwalają na oznaczenie płci zarodków z wysokim prawdopodobieństwem. Niemniej jednak zastosowanie ich w programach zachowania bioróżnorodności będzie przypuszczalnie ograniczone.

3.4. Klonowanie

Klonowanie jest techniką, która umożliwia reprodukcję ssaków metodami pozapłciowymi i otrzymywanie genetycznie identycznych osobników. Uzyskanie w 1996 r. Dolly (23), klonu owcy, było wydarzeniem przełomowym nie tylko w biotechnologii zwierząt. Klonowanie somatyczne wyodrębniło się wówczas jako nowy kierunek badań i wkrótce stało się jedną z najbardziej prężnie rozwijających się dziedzin biotechnologii rozrodu. Choć efektywność klonowania somatycznego jest ciągle bardzo niska i nie przekracza 1-2% urodzonych zwierząt to jednak w ciągu ostatnich lat sklonowano wiele gatunków ssaków takich jak: krowa, owca, koza, świnia, królik, kot, mysz. Przedstawiona lista wciąż się wydłuża. Dla genetycznego doskonalenia zwierząt metoda klonowania jest mało przydatna, gdyż redukuje zmienność populacji będącej tego doskonalenia warunkiem. Klonowanie umożliwia powielanie zwierząt o szczególnej wartości genetycznej i użytkowej.

Należy postawić pytanie, jakie są możliwości wykorzystania klonowania w ratowaniu ginących ras i gatunków ssaków, a nawet w restytucji gatunków już wymarłych? Przykładem zastosowania klonowania somatycznego do ratowania jednej ze skrajnie zagrożonych ras bydła było sklonowanie ostatniej żyjącej krowy „Lady” rasy Enderby Island (EI) (24). Rasa ta wywodzi się z bydła typu shorthorn, sprowadzonego w XIX w. na wyspę Enderby Island, należącą obecnie do Nowej Zelandii. W 2002 r. dwie sklonowane krowy po pokryciu buhajem (uzyskanym metodą IVF) rasy EI urodziły zdrowe cielęta. Obecnie populacja rasy EI liczy 7 osobników. Prowadzone są próby uzyskania kolejnych osobników tej rasy poprzez klonowanie.

Pomyślnie również sklonowano krowę pochodzącą z prymitywnej rodzimej koreańskiej rasy HanWoo (25).

Klonowanie somatyczne zagrożonych wyginięciem ras zwierząt gospodarskich związane jest z wieloma trudnościami wynikającymi m.in. z niskiej efektywności tej technologii. Trudności te w odniesieniu do zagrożonych wyginięciem dzikich gatunków ssaków są o wiele większe. Powodem tego jest z jednej strony słabo poznana fizjologia rozrodu dzikich zwierząt, z drugiej zaś brak możliwości uzyskiwania oocytów oraz przeszczepiania zrekonstruowanych zarodków. Dlatego też, jak się wydaje, jedynym rozwiązaniem jest międzygatunkowe klonowanie somatyczne. W tym typie klonowania jądra komórek somatycznych (głównie fibroblasty skóry) pobrane od dzikiego zwierzęcia metodą biopsji są przeszczepiane do enukleowanych oocytów uzyskanych od samic blisko spokrewnionego gatunku udomowionego lub od samic spokrewnionego powszechnie występującego gatunku dzikiego, którego rozród jest dobrze poznany. Pierwszą udaną próbą międzygatunkowego klonowania somatycznego było sklonowanie gaura (26), osobnika z gatunku zagrożonego wyginięciem. Oocyty uzyskano od krów, a zrekonstruowane zarodki przeszczepiono do krów-biorczyń. Urodzone cielę nazwane Noe żyło tylko kilka dni. Przypuszczalną przyczyną jego śmierci, jak sądzą autorzy uzyskanego klonu, była poważna infekcja, a nie czynniki związane z procedurą klonowania międzyga-

tunkowego. Uzyskany klon gaura jest dowodem, że międzygatunkowe klonowanie somatyczne może być stosowane w programach zachowania bioróżnorodności.

W rok po narodzinach gaura doniesiono o sklonowaniu muflona, żyjącego w małej populacji na Sardynii i Korsyce (27). Sklonowano również osobnika bantenga. Jest to gatunek dzikiego bydła żyjącego na Jawie. Podejmowane są również próby sklonowania górskiej odmiany antylopy bongo, kozy bucardo, dziko żyjących gatunków kotów oraz azjatyckiego geparda, pandy wielkiej i australijskiego torbacza wombat (cyt. 2).

Klonowanie zagrożonych ras czy gatunków ssaków budzi zarówno nadzieje, jak i obawy, wśród których najczęściej podawany jest argument, że ograniczać może w istotny sposób genetyczną różnorodność ras i gatunków. Może ono odegrać, jak się wydaje, istotną rolę w programach ich ratowania. Zapoczątkowano już na świecie program gromadzenia zamrożonych wycinków tkanek z możliwie największej liczby osobników zagrożonych gatunków, co pozwoli stworzyć genetyczną rezerwę tych gatunków umożliwiając w przyszłości ich rekonstrukcję. W Polsce, w Zakładzie Embriologii Doświadczalnej Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt w Jastrzębcu rozpoczęto tworzenie kolekcji linii komórkowych wyprowadzonych z tkanek zagrożonych gatunków *Bovidae* i *Cervidae*, jak również z tkanek rodzimych ras zwierząt gospodarskich, które znajdują się na liście zagrożonych (2).

3.5. Transgeneza

Transgeneza jest dziedziną biotechnologii zwierząt mającą duże możliwości wpływu na zmianę genomu zwierzęcia czyli modyfikację genomu poprzez wprowadzenie nowej informacji genetycznej. Stało się to możliwe dzięki postępowi badań, jaki osiągnięto w dziedzinie biologii molekularnej oraz embriologii. Metody biologii molekularnej dały możliwość przygotowania konstrukcji genowych odpowiedzialnych za wiele cech zwierząt. Od strony embriologicznej na początku lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku opracowano natomiast technikę wprowadzania genów do genomu wczesnych zarodków zwierząt. Opanowanie techniki wprowadzania genów do genomu zaowocowało m.in. uzyskaniem transgenicznych myszy, którym wszczepiono gen hormonu wzrostu szczura (28). Udane eksperymenty na myszach dały impuls do prowadzenia prac z zakresu transgenezy na dużych zwierzętach. W wielu ośrodkach naukowych podejmowane są próby zmiany tą metodą cech użytkowych zwierząt gospodarskich, takich jak większe przyrosty masy ciała, lepsze wykorzystanie paszy, mniejsza zawartość tłuszczu czy większa odporność na choroby. Prace z zakresu transgenezy prowadzone są również w Instytucie Zootechniki. Celem modyfikacji transgenicznych było m.in. uzyskanie nowych białek w mleku, uzyskanie właściwości bakteriostatycznych mleka czy też uzyskanie transgenicznych świń z genem ludzkiej fukozylotransferazy. Badania zaowocowały uzyskaniem transgenicznych królików, kóz, świń i bydła (29-31), a także transgenicznego knurka ze

zmodyfikowanym systemem immunologicznym w celu wykorzystania narządów do ksenotransplantacji u człowieka (32). Sądzi się, że największe znaczenie metoda transgenezy mieć będzie w uzyskiwaniu transgenicznych zwierząt z jednej strony będących swoistymi fabrykami leków, z drugiej zaś żywymi bankami tkanek i narządów wykorzystywanych do przeszczepu u ludzi (33).

Zachodzi pytanie czy można wykorzystać transgenezę w programach zachowania bioróżnorodności zwierząt? Transgeneza jako metoda jest, jak się wydaje, sprzeczna z celami, jakie przyświecają programom zachowania bioróżnorodności. Być może nie musi to dotyczyć na przykład zmian, jakie możemy uzyskać na drodze transgenezy w zakresie poprawy zdrowia zwierząt.

Reasumując, można zakładać, że większość prezentowanych metod biotechnologicznych jest i będzie w przyszłości wykorzystywanych w programach bioróżnorodności realizowanych zarówno metodami *in situ*, jak i *ex situ*. W przypadku krio-konserwacji gamet, zarodków i komórek somatycznych wykorzystanie ich jest i przypuszczalnie również w przyszłości będzie najszersze. Takie metody jak regulacja płci, transgeneza czy klonowanie będą, jak się wydaje, znajdować również zastosowanie w programach zachowania bioróżnorodności, w miarę jak ich efektywność będzie wzrastać.

Literatura

1. Convention on Biological Diversity – Declarations Official EU Journal L 309, 13/12/1993, 0003-0020.
2. Modliński J. A., Karasiewicz J., (2001), Postępy Biologii Komórki, supl., 18, 157-176.
3. Nagase H., Soejima A., Nowa T., Oshida H., Sagara Y., Ishizaki N., Hoshi S., (1966), J. Anim. Reprod., 12, 48.
4. Baczyński J., Bielański W., Bilik K., Kraus S., Zapletal Z., (1971), Zesz. Prob. Post. Nauk Rol., 124, 134-138.
5. Pinkel D., Lake S., Gledhill B. L., van Dilla M. A., Stephenson D., Watchmaker G., (1982), Cytometry, 3, 1-9.
6. Bochenek M., Smorąg Z., (2005), Medycyna Wet., 61, 50-52.
7. Kątska-Książkiewicz L., (2004), Biotechnologia, 1, 64, 32-42.
8. Smorąg Z., Gogol P., Kątska L., Jażdżewski J., (1999), Medycyna Wet., 55(5), 317-320.
9. Lyon M., Whittingham D. G., Glenister P., (1977), *The Freezing of Mammalian Embryos*, Eds. Elliot K., Whelan J., 52, 273, Ciba Foundation Symposium, Elsevier, Amsterdam.
10. Gajda B., Smorąg Z., (1998), Biotechnologia, 2, 41, 10-32.
11. Gajda B., Smorąg Z., (2003), Biotechnologia, 1, 60, 138-150.
12. Papis K., (2001), Medycyna Wet., 57(8), 537-616.
13. Gajda B., Smorąg Z., Kątska L., (2000), Roczn. Nauk. Zoot., supl., 5, 241-245.
14. Smorąg Z., Gajda B., (1994), Biotech. Adv., 12, 449-465.
15. Vajta G., Kuwayama M., (2006), Theriogenology, 65, 1, 236-244.
16. Gajda B., Smorąg Z., Wierzbowski S., Jura J., Wieczorek B., (1989), Zuchthygiene, 24, 97-100.

17. Smorąg Z., Gajda B., (1994), *Applied Biology Communications*, 4(1-2), 27-31.
18. Gajda B., Smorąg Z., Wieczorek J., (2004), *Medycyna Wet.*, 60 (4), 371-373.
19. Smorąg Z., Niedźwiadek S., Gajda B., Ryńska B., Bielański P., Fijał J., Gogol P., (1996), *Rocz. Nauk. Zoot., supl. 1*, 76-79.
20. Danchin-Burge C., Gajda B., Gandini G., Grigaliunaite I., Groeneveld E., Hiemstra S. J., Maki-Tanila A., Martin A., Pasztor M., Pizzi F., Schmidt T. A., Townsend S., Tvedt M. W., Windig J., Woelders H., (2004), *Guidelines for Constitution of National Cryopreservation Programmes for Farm Animals. European Regional Focal Point For Animal Genetic Resources*, Ed. Hiemstra S. J., 1-47, Centre for Genetic Resources, University and Research Center, Lelystad, The Netherlands.
21. Jura J., (1987), *Medycyna Wet.*, 43(1), 31-33.
22. Wayda E., Płucienniczak G., Jura J., Płucienniczak A., Kątska L., Skrzyszowska M., Smorąg Z., (1995), *Medycyna Wet.*, 9, 530-532.
23. Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Campbell K. H. S., (1997), *Nature*, 285, 810-813.
24. Wells D. N., Misica P. M., Tervit H. R., Vivanco W. H., (1998), *Reprod Fertil. Dev.*, 10, 369-378.
25. Hwang W. S., Park J. I., Cho J. K., Shin S. J., Kim K. Y., Shin T., Roh S., Lee E. S., Lee B. C., (2000), *Theriogenology*, 53, 220, abstr.
26. Lanza R. P., Cibelli J. B., Diza F., Moraes C. T., Farin P. W., Hammer C. J., West M. D., Damiani P., (2000), *Cloning*, 2, 79-90.
27. Loi P., Ptak G., Barboni B., Fulka J., Cappai P., Clinton M., (2000), *Nature Biotech.*, 54, 163-174.
28. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E., Trumbauer M. E., Rosenfeld M. G., Birnberg N. C., Evans R. M., (1982), *Nature*, 16, 300 (5893), 611-615.
29. Jura J., Smorąg Z., Gajda B., Kareta W., Kopchick J. J., Kelder B., Prieto A. P., (2000), *Ann. Anim. Sci.*, 27, 4, 105-113.
30. Jura J., Smorąg Z., Gajda B., Kareta W., Kopchick J. J., Kelder B., Prieto P. A., (2003), *Biotechnologia*, 1, 60, 216-222.
31. Smorąg Z., Jura J., Kopchick J. J., Gajda B., Skrzyszowska M., Różycki M., Pasięka J., (1998), *Biotechnologia*, 2, 41, 145-152.
32. Jura J., Smorąg Z., Gajda B., Wieczorek J., Lipiński D., Słomski R., (2006), *Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji*, red. Smorąg Z., Słomski R., Cierpka L., cz. II, 121-132, OWN Poznań.
33. Lipiński D., Jasiński A., Pławski A., Szalata M., Kurpisz M., Smorąg Z., (2006), *Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji*, red. Smorąg Z., Słomski R., Cierpka L., cz. I, 55-66, OWN Poznań.