

ZASTOSOWANIE NOWOCZESNYCH METOD BIOTECHNOLOGII ROZRODU W OCHRONIE *EX SITU* KRAJOWYCH RAS WYBRANYCH GATUNKÓW ZWIERZĄT GOSPODARSKICH

Monika Trzcńska*, Marcin Samiec*

Instytut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biotechnologii Rozrodu
i Kriokonserwacji, 32-083 Balice k. Krakowa

E-mail: monika.trzcinska@iz.edu.pl; E-mail: marcin.samiec@iz.edu.pl

*Monika Trzcńska i Marcin Samiec przyczynili się do powstania tego artykułu naukowego w jednakowym stopniu (równy wkład autorski).

ORCID

Monika Trzcńska ID: <https://orcid.org/0000-0001-9758-1304>

Marcin Samiec ID: <https://orcid.org/0000-0002-4060-1893>

Niniejsza praca naukowa uzyskała finansowanie ze środków zadań badawczych nr 01-19-10-21 oraz 04-19-13-11, realizowanych w Instytucie Zootechniki – Państwowym Instytucie Badawczym (IZ-PIB).

Abstrakt

W niniejszym artykule zaprezentowano kompleksową charakterystykę biologiczną i zootechniczną nowatorskich metod długoterminowego zabezpieczenia materiału biologicznego oraz biotechnologii reprodukcyjnej i embriologicznej stosowanych dla potrzeb ochrony ex situ rodzimych ras wybranych gatunków zwierząt gospodarskich, ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego (IZ-PIB) w Balicach w tym zakresie. Opracowanie biotechnologicznie wspomaganym programów ochrony ex situ stwarza nie tylko możliwość restytucji, lecz również utrwalenie zrównoważonej różnorodności biologicznej, która leży u podstaw wewnątrz- i międzypopulacyjnej zmienności genotypowo-fenotypowej w krajowych subpopulacjach zwierząt gospodarskich.

Słowa kluczowe: kriokonserwacja, liofilizacja, biotechnologia reprodukcyjna, biotechnologia embriologiczna, ochrona ex situ, zwierzęta gospodarskie, zagrożone rasy rodzime

Biologiczne uwarunkowania ochrony zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich ze szczególnym uwzględnieniem wybranych gatunków i ras rodzimych

Wewnątrz- i międzypopulacyjna dywergencja genotypowa jest warunkiem *sine qua non* dla zwiększonej zdolności stad hodowlanych do adaptacji do intensywnych lub ekstensywnych zmian antropogenicznych w biotopach rolniczych. Biorąc pod uwagę powyższe fakty, subpo-

populacje zwierząt gospodarskich wykazujące największe wskaźniki dywersyfikacji genetycznej wydają się wykazywać najbardziej pożądane tło genetyczne podatne na największy zakres adaptacji do niekorzystnych warunków ekosystemów zootechnicznych. To z kolei może znaleźć odzwierciedlenie w szybszym postępie ewolucyjnym ras zwierząt gospodarskich (Comizzoli i Holt, 2019; Bolton i in., 2022).

Zarówno intensyfikacja produkcji, jak i tworzenie nowych ras lub linii zwierząt gospodarskich o wysokiej wartości genetycznej lub wysokiej produktywności może znacząco zdestabilizować globalną różnorodność zwierząt udomowionych (Lauvie i in., 2011; Woelckers i in., 2012; Sun i in., 2022). Postępująca redukcja liczebności i różnorodności biologicznej ras zwierząt gospodarskich jest często wynikiem ostrej selekcji ukierunkowanej na doskonalenie genotypów determinujących wysoką wydajność fenotypowych cech wartości genetycznej i użytkowej poszczególnych subpopulacji i stad hodowlanych (Mara i in., 2013; Leroy i in., 2020; Polak i in., 2021). Dlatego też lokalne rasy o bardziej prymitywnych cechach są mniej powszechne lub zanikają kosztem wysokowydajnych, szeroko rozpowszechnionych ras produkcyjnych (Kikuchi i in., 2016; Dua i in., 2021; Son i in., 2021). Głównymi zagrożeniami dla malejącej bioróżnorodności zwierząt są zmiany środowiskowe związane z ekspansją obszarów uprawnych, a także wprowadzanie do środowiska gatunków preferowanych przez człowieka (Chen i in., 2018; Soglia i in., 2021). Z tych powodów szczególne znaczenie odgrywa ochrona zasobów genetycznych ras rodzimych, wysoce przystosowanych do lokalnych, często trudnych warunków klimatyczno-ekosystemowych, a jednocześnie odznaczających się wysoką odpornością i zdrowotnością. Z tego względu zachowanie bioróżnorodności ras zwierząt gospodarskich bazuje na realizacji programów ochrony *in situ* i *ex situ* (Polak i in., 2021; Jacques i in., 2023).

Preferowanym modelem ochrony zasobów genetycznych zwierząt, zarówno w Polsce, jak i na świecie jest ochrona *in situ*. Ta ostatnia polega na utrzymywaniu danego gatunku w jego naturalnym środowisku przy ograniczonym wykorzystaniu metod hodowlanych oraz pozwala na zachowanie takiej liczby zwierząt, aby zapewnić minimalną zmienność genetyczną i zdolność adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych (Ryder i Onuma, 2018; Elyasi Gorji i in., 2021). Programy dedykowane ochronie *in situ* rzadkich rodzimych ras zwierząt gospodarskich powinny mieć charakter predykcyjny i uwzględniać w swoich działaniach zmiany warunków środowiskowych i ekosystemowych (Bai i in., 2011; Wood i in., 2018).

Wdrażanie nowoczesnych strategii biotechnologii reprodukcyjnej i embriologicznej, opartych na kriokonserwacji, liofilizacji i pozaustrojowym uzyskiwaniu zarodków do ochrony *ex situ* zasobów genetycznych wybranych ras zwierząt gospodarskich w Polsce

Ochrona *ex situ* opiera się na wykorzystaniu metod biotechnologicznych w celu pozyskiwania i długoterminowego gromadzenia materiału biologicznego np. w postaci nasienia, komórek somatycznych czy komórek macierzystych, pochodzących od różnych gatunków i ras zwierząt gospodarskich. Opracowanie i optymalizacja procedur kriokonserwacji oraz liofilizacji (tj. suszenia sublimacyjnego) pozwoliły na długoterminowe przechowywanie materiału biologicznego (Comizzoli i Wildt, 2013; Comizzoli i Holt, 2014). W odróżnieniu od kriokonserwacji liofilizacja umożliwia zabezpieczanie materiału biologicznego w temperaturze powyżej 0°C (León-Quinto i in., 2014; Silyukova i in., 2020).

Długoterminowo zabezpieczony materiał biologiczny pobrany od osobników zagrożonych gatunków i ras zwierząt gospodarskich może w przyszłości posłużyć do biotechnologicznie wspomaganego odtworzenia utraconej biocenozy oraz jej reintrodukcji w poszczegól-

nych niszach biotopu ekosystemów naturalnych i antropogenicznych ekosystemów rolniczych, a nawet do biocenotycznego przywrócenia i restytucji gatunków i ras zwierząt hodowlanych (Comizzoli i Wildt, 2013; Keskintepe i Eroglu, 2021; Jacques i in., 2023).

Kriokonserwacja materiału biologicznego będącego nośnikami tzw. plazmy płciowej (ang. *germplasm*), tj. plemników, charakteryzuje się najwyższym stopniem zaawansowania i skuteczności. Dlatego też procedura ta znajduje szerokie zastosowanie w technologiach wspomaganego rozrodu (ARTs; ang. *assisted reproductive technologies*) i programach ochrony *ex situ* szerokiego spektrum gatunków i ras zwierząt gospodarskich. W ostatnich latach IZ-PIB prowadził kompleksowe badania ukierunkowane na zwiększenie skuteczności kriokonserwacji nasienia pochodzącego od różnych gatunków zwierząt gospodarskich (Trzcńska i Bryła, 2015; Trzcńska i in., 2015). Aby zapewnić wysoką jakość kriogenicznie zabezpieczonych plemników pobranych od samców reprezentujących rozmaite gatunki zwierząt gospodarskich, nasienie przeznaczone do kriokonserwacji jest poddawane wielopłaszczyznowej ocenie biologicznej. Badania mające na celu identyfikację i dokładną ocenę indukowanej czynnikami kriogenicznymi, ultrastrukturalnej i funkcjonalnej biodegradacji wewnątrzkomórkowych organelli oraz cytoszkieletu, membranoszkieletu oraz błony plazmatycznej (plazmolemmy), a także wykrywanie objawów proapoptotycznych i/lub pronekrotycznych, autofagicznych i mitofagicznych w plemnikach są zatem tymi, których znaczenia nie można przecenić (Comizzoli, 2015; Yeste, 2016; Song i in., 2021; Wu i in., 2023). Występowanie procesów wewnątrzplemnikowych wywołanych przez kriogenicznie indukowaną biodestrukcję może być zminimalizowane poprzez suplementację rozcieńczalników związkami o działaniu krioprotekcyjnym lub związkami o właściwościach antyoksydacyjnych, usuwającymi wolne rodniki tlenowe, tj. oksydanty (ODFRs; ang. *oxygen-derived free radicals*) (Trzcńska i in., 2015; Len i in., 2019; Bolton i in., 2022).

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie nową techniką konserwacji nasienia ssaków, zwaną liofilizacją, suszeniem sublimacyjnym lub dehydratacją sublimacyjną. Technika ta stanowi alternatywę dla kriokonserwacji nasienia w ciekłym azocie. Biofizycznym mechanizmem leżącym u podstaw tej techniki jest proces odwadniania w niskiej temperaturze, który obejmuje zamrażanie próbek nasienia i obniżanie ciśnienia, co razem prowadzi do eliminacji wewnątrzkomórkowych kryształów lodu (powstałych podczas procesu zamrażania) w wyniku sublimacji (Comizzoli i Wildt, 2013; Comizzoli i in., 2022a, b). Z kolei sublimacja jest przejściem fazowym bezpośrednio ze stanu stałego do gazowego, bez przechodzenia przez stan ciekły. Sublimacja jest procesem endotermicznym, który zachodzi na poziomach temperatur i ciśnień poniżej punktu potrójnego substancji na jej diagramie fazowym, który jest skorelowany z najniższym ciśnieniem, przy którym roztwory wodne mogą istnieć jako ciecz (Saragusty i Loi, 2019; Keskintepe i Eroglu, 2021).

Dotychczasowe badania wykazały, że liofilizowane (tj. poddane suszeniu sublimacyjnemu) plemniki mogą ulegać procesom biodestrukcji w obrębie błony plazmatycznej i/lub genomowego DNA, które zostały oddzielnie lub zbiorowo uszkodzone w wyniku wystąpienia stresu oksydacyjnego i zaburzeń zachodzących w procesach antyoksydacyjnych. Te ostatnie mogą być z kolei wywołane przez bioakumulację reaktywnych form tlenu (ROS; ang. *reactive oxygen species*) i zmniejszenie stężenia nieenzymatycznych antyoksydantów lub osłabienie aktywności biokatalitycznej endogennych izoenzymów (izozymów) o silnym działaniu przeciwutleniającym, czyli akceptorów ODFRs (Olaciregui i in., 2016; Thiangthientham i in., 2023). Aby zmniejszyć częstość biodegradacji DNA, indukowanej przez ROS, podczas liofilizacji plemników, podjęto próby zwiększenia aktywności antyoksydacyjnej endogennych izozymów eliminujących oksydanty z grupy ODFRs, co można osiągnąć poprzez wzbogacenie liofilizatu komórkowego egzogennymi, rozpuszczalnymi w wodzie przeciwutleniaczami fenolowymi (polifenolowymi) o działaniu lioprotekcyjnym. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują: 1) należący do depsyków, tj. międzycząsteczkowych estrów kwasów fenolokar-

boksylowych, kwas rozmarynowy (RosA; złożony ester kwasu kawowego (kofeinowego) – przedstawiciela kwasów hydroksycynamonowych oraz kwasu α -hydroksydihydrokawowego, czyli kwasu 3,4-dihydroksyfenylomlekowego); 2) kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA) oraz 3) kwas etylenoglikolo-*bis*(β -aminoetylo)-N,N,N',N'-tetraoctowy (EGTA) (Olaciregui i in., 2017; Domingo i in., 2018; Mercati i in., 2020).

Warto podkreślić, że odchylenia w takich parametrach jakości nasienia, jak żywotność, ruchliwość, a nawet stabilność DNA, nie wykluczają przydatności liofilizowanych, a następnie ponownie uwodnionych (tj. poddanych rehydratacji) plemników do procedur docytoplazmatycznej iniekcji plemników (ICSI) przeprowadzanych w celu zapłodnienia *in vitro* oocytów w stadium metafazy II (MII) u gatunków zwierząt gospodarskich (Comizzoli i Wildt, 2013; Keskinetepe i Eroglu, 2021; Thiangthientham i in., 2023). Niemniej jednak utrzymanie warunków ułatwiających obniżenie częstości występowania biodegradacji lub internukleosomalnej fragmentacji DNA podczas liofilizacji plemników może w znacznym stopniu poprawić możliwość zastosowania ICSI do zapłodnienia *in vitro* (IVF), nawet jeśli męskie gamety wykazują wysoką częstotliwość występowania nie tylko ultrastrukturalnych i biofizycznych zaburzeń w organellach i przedziałach wewnątrzkomórkowych plemników, ale także hiperpermeabilizacji lub biochemicznej destabilizacji integralności plazmolemy (Olaciregui i in., 2016; Comizzoli i in., 2022a, b).

Jak dotąd, zastosowanie zapłodnienia *in vitro* (IVF) za pośrednictwem ICSI mejotycznie dojrzałych oocytów przy użyciu liofilizowanych plemników, a następnie ponowne nawodnienie wcześniej liofilizowanych plemników przyczyniło się do uzyskania potomstwa u wielu różnych gatunków ssaków, w tym zwierząt gospodarskich. Gatunki te obejmują chomiki (Muneto i Horiuchi, 2011), myszy (Kaneko i in., 2003), szczury (Hirabayashi i in., 2005), króliki (Li i in., 2009) i konie (Choi i in., 2011).

W przeciwieństwie do wyżej wymienionych badań, próby uzyskania potomstwa przy zastosowaniu zapłodnienia *in vitro* oocytów metodą ICSI z użyciem liofilizowanych/rehydratowanych (tj. uwodnionych *de novo*) plemników nie zakończyły się uzyskaniem potomstwa u bydła (Hara i in., 2014), owiec (Palazzese i in., 2018) ani świń (Olaciregui i in., 2017). Niemniej jednak badania te skutkowały rozwojem zarodków do stadium blastocysty w warunkach hodowli *in vitro*.

W IZ-PIB opracowano skuteczne metody zarówno kriokonserwacji, jak i liofilizacji nasienia zwierząt gospodarskich. Kriokonserwowane lub liofilizowane plemniki, podobnie jak krio- lub liofilizogenicznie zabezpieczone komórki somatyczne bądź komórki macierzyste, mogą być wykorzystane w szerokim panelu technologii ARTs opartych na pozaustrojowym uzyskiwaniu zarodków (IVP; ang. *in vitro embryo production*).

Kompleksowa strategia IVP składa się z trzech następujących po sobie etapów: (1) dojrzewanie mejotyczne *in vitro* oocytów (tj. hodowla niedojrzałych mejotycznie oocytów w stadium diplotenu/diktiotenu profazy I podziału mejotycznego do uzyskania stadium metafazy II podziału mejotycznego (MII); (2) zapłodnienie *in vitro* oocytów (IVF) lub rekonstrukcja enukleowanych (wyjądrzonych) oocytów metodą klonowania somatycznego (czyli techniki transplantacji jąder komórek somatycznych; SCNT, ang. *somatic cell nuclear transfer*); oraz (3) hodowla *in vitro* (IVC) zarodków uzyskanych w wyniku zastosowania IVF lub SCNT (Glanzner i in., 2018; Samiec i in., 2019; Nguyen i in., 2020).

Adekwatnie do standardowej procedury sztucznej inseminacji (AI; ang. *artificial insemination*), w celu efektywnego przeprowadzenia prób IVF o powtarzalnej skuteczności, kriogenicznie zabezpieczone gamety męskie mogą być wykorzystane albo do konwencjonalnej współinkubacji oocytów w stadium MII z ruchliwymi plemnikami, albo do wspomaganego zapłodnienia *in vitro* przy użyciu mikrochirurgicznej techniki docytoplazmatycznej iniekcji plemnika (ICSI; ang. *intracytoplasmic sperm injection*) (Fowler i in., 2018; Magata i in., 2019; Zuo i in., 2020). Alternatywnie na potrzeby zapłodnienia *in vitro* oocytów w stadium

MII metodą ICSI można wykorzystać również liofilizowane plemniki (sublimacyjnie odwodnione/dehydratowane), a następnie uwodnione *de novo* (rehydratowane) plemniki do mikrochirurgicznego zdeponowania w ooplazmie (Ushigome i in., 2022; Thiangthientham i in., 2023). Analogicznie, w przypadku zastosowania klonowania techniką SCNT na potrzeby kompleksowej technologii IVP, źródło dawców jąder w procedurze rekonstrukcji enukleowanych oocytów mogą stanowić nie tylko kriokonserwowane/rozmrózone i hodowane *in vitro* komórki somatyczne lub multipotentne/pluripotentne komórki macierzyste, lecz także ich odpowiedniki uprzednio poddane procesom liofilizacji (suszenia sublimacyjnego), a następnie rehydratacji (Ono i in., 2008; Natan i in., 2009; Zhang i in., 2017; Dang-Nguyen i in., 2020).

W odniesieniu do oocytów poddanych zapłodnieniu wspomaganemu za pośrednictwem metody ICSI, kluczową rolę odgrywa także sztuczna stymulacja ich zarodkowego programu rozwojowego, która może być indukowana przy zastosowaniu fizycznych i/lub chemicznych czynników aktywujących np. impulsów prądu stałego lub antybiotyków jonoforowych, takich jak: jonomycyna wapnia, czy jonofor wapnia A23187 (kalcymycyna), które są odpowiedzialne za jonoforetyczny transport doooplazmatyczny kationów wapnia ze środowiska pozakomórkowego oraz za wywoływanie wewnątrzkomórkowej transdukcji sygnałów kalcemicznych (Ashibe i in., 2019; Ressaissi i in., 2021). Co więcej, epigenomowa przeprogramowalność chromosomów pochodzenia matczyne (oocytarne) oraz ojcowskiego (plemnikowe) również wywiera istotny wpływ na przed- i poimplantacyjne kompetencje rozwojowe zarodków uzyskanych w następstwie IVF lub ICSI (Kropp i in., 2017; Diao i in., 2018; Takeda i in., 2019). Ponadto dwa inne czynniki natury molekularnej, takie jak: intertranskryptomiczna i interproteomiczna komunikacja między frakcjami DNA jądrowego i mitochondrialnego (Tsai i St. John, 2018; Zuidema i Sutovsky, 2020) oraz inicjacja procesów nekrotycznych, apoptotycznych lub autofagicznych (Jin i in., 2016; Rodríguez i in., 2019; Ramos-Ibeas i in., 2020) niewątpliwie nie pozostają bez znaczenia dla potencjału rozwojowego *ex vivo* i *in vivo* oraz jakości IVF- lub ICSI-pochodnych zarodków u wielu różnych gatunków i ras zwierząt gospodarskich.

W celu ochrony *ex situ* różnorodnego materiału biologicznego pochodzącego od rodzimych ras wybranych gatunków zwierząt gospodarskich (owiec, bydła, kóz, świń i kaczek), łącznie, długoterminowe działania podjęte przez IZ-PIB doprowadziły do zgromadzenia zabezpieczonych krio- i/lub liofilizogenicznie biorepozytoriów obejmujących szerokie spektrum zasobów genetycznych (tab. 1). Te ostatnie obejmują również materiały będące nośnikami tzw. plazmy płciowej (ang. *germplasm-carrying materials*), takie jak: kriokonserwowane i/lub liofilizowane plemniki tryków ras: wrzosówka polska, romanowska, czarnogłówka, olkuska i knurów ras: wielka biała polska i polska biała zwisłoucha (tab. 1).

Tabela 1. Biorezerwuary IZ-PIB obejmujące różne rodzaje zabezpieczonego *ex situ* materiału biologicznego pochodzącego od rodzimych ras wybranych gatunków zwierząt gospodarskich
 Table 1. The biorepositories deposited in the National Research Institute of Animal Production in Poland that encompass *ex situ* protected biological materials stemming from native breeds of selected livestock species

Gatunek Species	Rasa Breed	Material biologiczny Biological material	Metoda konserwacji Method of conservation	Liczba próbek (nasienie: słomki i/lub kulki; fibroblasty dermalne/komórki macierzyste: linie komórkowe) Number of samples (semen: straws and/or pellets; cutaneous fibro- blasts/stem cells; cell lines)	Liczba dawczyń Number of female donors	Liczba dawców Number of male donors	
Owca domowa Domestic sheep	Wrzosówka polska Polish Heath	Nasienie Semen	Kriokonserwacja Cryoconservation	587	-	8	
		Fibroblasty dermalne Cutaneous fibroblasts		15	3	3	
	Romanowska Romanov	Nasienie Semen		968	-	5	
		Fibroblasty dermalne Cutaneous fibroblasts		32	3	3	
	Czarnogłówka Blackhead	Nasienie Semen		788	-	4	
	Olkuska Olkuska			3519	-	8	
Merynos w starym typie Old Type Merino			22	3	3		
Koza domowa Domestic goat	Karpacka Carpathian	Fibroblasty dermalne Cutaneous fibroblasts		13	3	3	
Bydło domowe Domestic cattle	Polska czerwona Polish Red			45	5	-	
Świnia domowa Domestic pig	Wielka biała polska Polish Large White	Nasienie Semen	Liofilizacja Lyophilization	720	-	7	
		Fibroblasty dermalne Cutaneous fibroblasts		34	7	8	
	Polska biała zwisłoucha Polish Landrace	Nasienie Semen		645	-	6	
		Fibroblasty dermalne Cutaneous fibroblasts		160	-	4	
	Złotnicka pstra Złotnicka Spotted	Mezenchymalne komórki macierzyste Mesenchymal stem cells			19	4	3
					39	20	-
Puławska Puławska	Fibroblasty dermalne Cutaneous fibroblasts	Kriokonserwacja Cryoconservation	22	6	-		
Kaczka domowa Domestic duck	K-2	Blastodermalno-pochodne zarodkowe komórki macierzyste		71	10	1	
	KhO-01		10	50	-		
	P-9	Blastoderm-derived embryonic stem cells		10	50	-	
			8	40	-		

Wdrażanie nowoczesnych strategii biotechnologii reprodukcyjnej i embriologicznej opartych na klonowaniu somatycznym do ochrony *ex situ* zasobów genetycznych wybranych polskich ras zwierząt gospodarskich

W ramach ochrony bioróżnorodności tworzenie biorezerwarów linii komórek somatycznych i macierzystych poprzez ich kriogeniczną konserwację może być wykorzystywane jako strategia przydatna nie tylko do utrzymania populacji chronionych gatunków ssaków żyjących na wolności, ale także do reintrodukcji antropogenicznych ekosystemów rolniczych zanikających ras zwierząt gospodarskich, których subpopulacje charakteryzują się drastycznym spadkiem liczebności i wysokim stopniem inbredu (Men i in., 2012; Gavin-Plagne i in., 2020).

Biotechnologia reprodukcyjna, obejmująca klonowanie zwierząt za pośrednictwem techniki transplantacji jąder komórek somatycznych do enukleowanych oocytów (SCNT; ang. *somatic cell nuclear transfer*), wydaje się być niezbędnym narzędziem do utrwalenia długoterminowej ochrony *ex situ* i/lub *in situ* różnorodności biologicznej rodzimych ras różnych gatunków zwierząt gospodarskich, w tym zagrożonych wyginięciem, a nawet wymarłych ras zwierząt gospodarskich. Te ostatnie są szczególnie narażone na:

- 1) wysoce zintensyfikowane efekty „wąskiego gardła” wynikające z osłabionego dryftu genetycznego;
- 2) szybką erozję genetyczną skutkującą znacznym obniżeniem wewnątrzpopulacyjnej i międzyosobniczej dywergencji genotypowej;
- 3) finalne drastyczne zmniejszenie wielkości populacji (Caroli i Pizzi, 2012; Leroy i in., 2020).

Biorąc pod uwagę wyżej wskazane uwarunkowania, wyprowadzenie, multiplikacja *ex vivo* i późniejsza kriokonserwacja stabilnych proliferacyjnie linii komórek somatycznych lub macierzystych, pochodzących z różnych eksplantów tkankowych, stanowi alternatywne lub uzupełniające podejście badawcze do procedur zamrażania lub witrifikacji gamet i zarodków. Tego typu działania są podejmowane nie tylko w celu ratowania zagrożonych gatunków i ras zwierząt gospodarskich przed wyginięciem, ale także skutecznej realizacji programów ochrony *ex situ* i/lub *in situ* gatunkowo- lub rasowo-specyficznej różnorodności biologicznej (Smits i in., 2012; Enya i in., 2016; Hu i in., 2022).

Z jednej strony, generowanie zasobów genetycznych w postaci linii komórek somatycznych (np. fibroblastów) lub multipotentnych komórek macierzystych, pochodzących od wybranych gatunków zwierząt gospodarskich wydaje się być skutecznym modelem badawczym dla zachowania bioróżnorodności rzadkich rodzimych ras. Z drugiej, utworzenie i pozaustrojowe namnażanie takich zasobów genetycznych na potrzeby wewnątrz- i międzygatunkowego klonowania zwierząt techniką SCNT może stanowić w przyszłości jedyny instrument oferujący możliwość odtwarzania i reintrodukcji ginących gatunków i ras zwierząt udomowionych i wolnożyjących (Borges i in., 2020; Praxedes i in., 2021). W związku z tym niezbędne jest podejmowanie takich wysiłków, które są ukierunkowane na precyzyjną identyfikację czynników determinujących zdolność proliferacyjną, stabilność genetyczną, starzenie cytokinetyczne i zaprogramowaną genetycznie śmierć (apoptozę i/lub autofagię) w hodowanych *in vitro* subpopulacjach klonalnych linii/szczepów komórek somatycznych – dawców jąder. Identyfikacja powyższych czynników może prowadzić do poprawy i przyspieszenia epigenomowej przeprogramowalności jąder komórek somatycznych w zarodkach klonalnych (Jeong i in., 2020; Samiec i in., 2022). Celem takich procedur jest utrwalenie prawidłowego wzorca dziedziczenia pożądanego genów w stadach zagrożonych wyginięciem ras i zmniejszenie stopnia inbredu w obrębie populacji, a tym samym zwiększenie zróżnicowania „tła” genotypowego (ang. *genotypic background*) wśród zagrożonych rodzimych ras zwierząt gospodarskich. Co więcej, postęp prac badawczych prowadzących do intensyfikacji międzygatunkowej różnorodności genetycznej może wpływać na wzrost fizjologicznej i immunologicznej odporności

osobniczej na drastyczne zmiany środowiskowe i klimatyczne lub na rozprzestrzenianie się chorób zakaźnych o charakterze epidemicznym oraz pandemicznym (Leroy i in., 2016).

Nie bez znaczenia pozostaje fakt, że w IZ-PIB opracowano skuteczne metody ekspansji *ex vivo* i kriokonserwacji stabilnych mitotycznie linii komórek fibroblastycznych pochodzących z układu skórno-powłokowego osobników obojga płci, będących przedstawicielami zagrożonych wyginięciem krajowych ras zwierząt gospodarskich, takich jak: wrzosówka polska, owca romanowska, merynos w starym typie, koza karpacka, bydło polskie czerwone, świnia złotnicka pstra i świnia puławska. W rezultacie, w ramach IZ-PIB utworzono biorepozytoria:

- 1) kriogenicznie zabezpieczonych linii komórek somatycznych wyprowadzonych z bioptatów tkanki skórno-powłokowej wyizolowanych z małżowin usznych wymienionych wyżej ginących ras rodzimych;
- 2) proliferacyjnie ustabilizowanych linii multipotentnych mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs; ang. *mesenchymal stem cells*) pochodzących ze szpiku kostnego oraz tkanki tłuszczowej młodocianych osobników płci żeńskiej świń rasy polskiej białej zwisłouchej;
- 3) blastodermalno-pochodnych zarodków komórek macierzystych, wyizolowanych z tarczek zarodkowych zapłodnionych jaj trzech ras/rodów/linii kaczki domowej, objętych krajowym programem zasobów genetycznych drobiu wodnego.

Szczegółowe zestawienie biorepozytoriów przedstawiono w tabeli 1.

Skuteczność klonowania za pośrednictwem techniki SCNT u wielu różnych gatunków zwierząt gospodarskich zależy w dużym stopniu od pochodzenia i parametrów jakości molekularnej wyprowadzonych i namnażanych w warunkach pozaustrojowych linii zróżnicowanych komórek somatycznych lub niezróżnicowanych, multipotentnych komórek macierzystych oraz od rodzaju metod, mediów oraz stabilizatorów bioorganicznych, użytych do ich zabezpieczania *ex situ* (kriokonserwacji lub liofilizacji) (Das i in., 2010; Lee i in., 2019; Zhang i in., 2019; Wiater i in., 2021; Wakayama i in., 2022), a także od częstości występowania symptomów śmierci apoptotycznej i autofagicznej w hodowanych *in vitro* komórkach-dawcach jąder i/lub w blastomerach zarodków klonalnych (Chi i in., 2017; Jeong i in., 2020). Innym czynnikiem determinującym wydajność metody SCNT jest zdolność jąder komórek somatycznych lub macierzystych do epigenetycznego przemodelowania i przeprogramowania w cytoplazmie zrekonstruowanych oocytów oraz w blastomerach rozwijających się zarodków klonalnych (Sampaio i in., 2020; Wang i in., 2020; Samiec i in., 2022). Wykazano również, że genomowe, transkryptomyczne i proteomiczne interakcje między frakcjami jądrowego i mitochondrialnego DNA wpływają w znaczącym stopniu na kompetencje rozwojowe zarodków uzyskiwanych techniką klonowania somatycznego (Takeda, 2019; Magalhães i in., 2020; Samiec i Skrzyszowska, 2021).

Podsumowując, na obecnym etapie badań wydajność klonowania ssaków w oparciu o technikę SCNT pozostaje niezwykle niska, wahając się od około 0,5% do średnio 5% uzyskiwanego potomstwa klonalnego w odniesieniu do całkowitej liczby oocytów zrekonstruowanych z jąder różnych typów komórek somatycznych i macierzystych. Biorąc pod uwagę ten fakt, dogłębne poznanie genomowych, epigenomowych, transkryptomicznych i proteomicznych sygnatur istotnie determinujących zdolności jąder komórek dawców do prawidłowego i kompletnego przeprogramowania molekularnego w blastomerach rozwijających się zarodków klonalnych jest niewątpliwie warunkiem *sine qua non* niezbędnym do znacznej poprawy potencjału rozwojowego zarodków, płodów i potomstwa klonalnego u różnych gatunków ssaków, w tym zwierząt gospodarskich (Wiater i in., 2021; Zhang i in., 2021).

Wnioski końcowe, przyszłe cele i perspektywiczne kierunki badań

Doskonalenie ras zwierząt hodowlanych – jako dynamiczny proces obejmujący gatunkowo-specyficzne zmiany genetyczne – jest determinowane przez czynniki środowiskowe i ekosystemowe (biocenotyczne i biotopowe) oraz rolnicze czynniki antropogeniczne. W początkowej fazie różnorodność biologiczna ras zwierząt gospodarskich ulegała intensyfikacji i stopniowej dywersyfikacji w wyniku wpływu sprzyjających warunków hodowlanych. Doprowadziło to do utrwalenia dywergencji genotypowo-fenotypowej poszczególnych ras zwierząt gospodarskich, także wskutek implementacji różnych strategii genetycznie lub biotechnologicznie wspomaganej reprodukcji oraz programów ochrony *ex situ* poprzez tworzenie biorepozytoriów kriogenicznie i liofilizogenicznie zabezpieczonych gamet męskich oraz linii komórek somatycznych i macierzystych. Te ostatnie mają na celu zrównoważone utrwalenie różnorodności genotypowej i fenotypowej wśród udomowionych gatunków zwierząt występujących w antropogenicznych niszach ekosystemów rolniczych (Mara i in., 2013; Bolton i in., 2022; Jacques i in., 2023).

Po przejściu z fazy badań podstawowych do badań stosowanych, strategie wykorzystywane do generowania zasobów składających się z plemników oraz linii komórek somatycznych i multipotentnych/pluripotentnych komórek macierzystych, a następnie ich używania do procedur biotechnologii reprodukcyjnej i embriologicznej, takich jak pozaustrojowe uzyskiwanie zarodków w oparciu o IVF, ICSI lub SCNT mogą charakteryzować się coraz większym potencjałem aplikacyjnym nie tylko w badaniach zootechnicznych i rolniczej produkcji zwierzęcej, lecz także w badaniach interdyscyplinarnych na styku biologii i biotechnologii molekularnej, nanotechnologii, biomedycyny przedklinicznej i klinicznej, biofarmacji, nutritechologii oraz dziedzin obejmujących żywienie i dietetykę człowieka.

Piśmiennictwo

- Ashibe S., Miyamoto R., Kato Y., Nagao Y. (2019). Detrimental effects of oxidative stress in bovine oocytes during intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Theriogenology*, 133: 71–78.
- Bai C., Wang D., Li C., Jin D., Li C., Guan W., Ma Y. (2011). Establishment and biological characteristics of a Jingning chicken embryonic fibroblast bank. *Eur. J. Histochem.*, 55: e4.
- Bolton R.L., Mooney A., Pettit M.T., Bolton A.E., Morgan L., Drake G.J., Appeltant R., Walker S.L., Gillis J.D., Hvilsom C. (2022). Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking. *Reprod. Fertil.*, 3: R121–R146.
- Borges A.A., Lira G.P.O., Nascimento L.E., Santos M.V.O., Oliveira M.F., Silva A.R., Pereira A.F. (2020). Isolation, characterization, and cryopreservation of collared peccary skin-derived fibroblast cell lines. *PeerJ*, 8: e9136.
- Caroli A.M., Pizzi F. (2012). Livestock biodiversity: from genes to animal products through safeguard actions. *Theor. Biol. Forum.*, 105: 71–82.
- Chen F., Zhao C., Zhao Y., Li L., Liu S., Zhu Z., Guan W. (2018). The biological characteristics of sheep umbilical cord mesenchymal stem cells. *Can. J. Vet. Res.*, 82: 216–224.
- Chi D., Zeng Y., Xu M., Si L., Qu X., Liu H., Li J. (2017). LC3-dependent autophagy in pig 2-cell cloned embryos could influence the degradation of maternal mRNA and the regulation of epigenetic modification. *Cell. Reprogram.*, 19: 354–362.
- Choi Y.H., Varner D.D., Love C.C., Hartman D.L., Hinrichs K. (2011). Production of live foals via intracytoplasmic injection of lyophilized sperm and sperm extract in the horse. *Reproduction*, 142: 529–538.

- Comizzoli P. (2015). Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian J. Androl.*, 17: 640–645.
- Comizzoli P., Holt W.V. (2014). Recent advances and prospects in germplasm preservation of rare and endangered species. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 753: 331–356.
- Comizzoli P., Holt W.V. (2019). Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species. *Biol. Reprod.*, 101: 514–525.
- Comizzoli P., Wildt D.E. (2013). Mammalian fertility preservation through cryobiology: value of classical comparative studies and the need for new preservation options. *Reprod. Fertil. Dev.*, 26: 91–98.
- Comizzoli P., Amelkina O., Lee P.C. (2022a). Damages and stress responses in sperm cells and other germplasms during dehydration and storage at nonfreezing temperatures for fertility preservation. *Mol. Reprod. Dev.*, 89: 565–578.
- Comizzoli P., He X., Lee P.C. (2022b). Long-term preservation of germ cells and gonadal tissues at ambient temperatures. *Reprod. Fertil.*, 3: R42–R50.
- Dang-Nguyen T.Q., Thi Men N., Thi Nguyen H., Noguchi J., Kaneko H., Kikuchi K. (2020). Doubling of the cytoplasm volume improves the developmental competence of porcine oocytes injected with freeze-dried somatic cells. *Cryobiology*, 97: 131–137.
- Das Z.C., Gupta M.K., Uhm S.J., Lee H.T. (2010). Lyophilized somatic cells direct embryonic development after whole cell intracytoplasmic injection into pig oocytes. *Cryobiology*, 61: 220–224.
- Diao Y.F., Lin T., Li X., Oqani R.K., Lee J.E., Kim S.Y., Jin D.I. (2018). Dynamic changes of SETD2, a histone H3K36 methyltransferase, in porcine oocytes, IVF and SCNT embryos. *PLoS One*, 13: e0191816.
- Domingo P., Olaciregui M., González N., De Blas I., Gil L. (2018). Long-term preservation of freeze-dried rabbit sperm by adding rosmarinic acid and different chelating agents. *Cryobiology*, 81: 174–177.
- Dua S., Sharma P., Saini M., Rawat N., Rajendran R., Bansal S., Wakil A.M., Beniwal M., Parashar A., Bajwa K.K., Selokar N.L., Kumar R., Kumar D., Yadav P.S. (2021). Cryobanking of primary somatic cells of elite farm animals – A pilot study in domesticated water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Cryobiology*, 98: 139–145.
- Elyasi Gorji Z., Farzaneh P., Nasimian A., Ganjibakhsh M., Izadpanah M., Farghadan M., Vakhshiteh F., Rahmati H., Shahzadeh Fazeli S.A., Khaledi H., Daneshvar Amoli A. (2021). Cryopreservation of Iranian Markhoz goat fibroblast cells as an endangered national genetic resource. *Mol. Biol. Rep.*, 48: 6241–6248.
- Enya S., Kawarasaki T., Otake M., Kangawa A., Uenishi H., Mikawa S., Nishimura T., Kuwahawa Y., Shibata M. (2016). Preservation and Reproduction of Microminipigs by Cloning Technology. *In Vivo*, 30: 617–622.
- Fowler K.E., Mandawala A.A., Griffin D.K., Walling G.A., Harvey S.C. (2018). The production of pig preimplantation embryos in vitro: Current progress and future prospects. *Reprod. Biol.*, 18: 203–211.
- Gavin-Plagne L., Perold F., Osteil P., Voisin S., Moreira S.C., Combourieu Q., Saïdou V., Mure M., Louis G., Baudot A., Buff S., Joly T., Afanassieff M. (2020). Insights into Species Preservation: Cryobanking of Rabbit Somatic and Pluripotent Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 21: 7285.
- Glanzner W.G., Rissi V.B., De Macedo M.P., Mujica L.K.S., Gutierrez K., Bridi A., De Souza J.R.M., Gonçalves P.B.D., Bordignon V. (2018). Histone 3 lysine 4, 9, and 27 demethylases expression profile in fertilized and cloned bovine and porcine embryos. *Biol. Reprod.*, 98: 742–751.

- Hara H., Tagiri M., Hwang I.S., Takahashi M., Hirabayashi M., Hochi S. (2014). Adverse effect of cake collapse on the functional integrity of freeze-dried bull spermatozoa. *Cryobiology*, 68: 354–360.
- Hirabayashi M., Kato M., Ito J., Hochi S. (2005). Viable rat offspring derived from oocytes intracytoplasmically injected with freeze-dried sperm heads. *Zygote*, 13: 79–85.
- Hu T., Taylor L., Sherman A., Keambou Tiambo C., Kemp S.J., Whitelaw B., Hawken R.J., Djikeng A., McGrew M.J. (2022). A low-tech, cost-effective and efficient method for safeguarding genetic diversity by direct cryopreservation of poultry embryonic reproductive cells. *eLife*, 25: e74036.
- Jacques A., Leroy G., Rognon X., Verrier E., Tixier-Boichard M., Restoux G. (2023). Reintroducing genetic diversity in populations from cryopreserved material: the case of Abondance, a French local dairy cattle breed. *Genet. Sel. Evol.*, 55: 28.
- Jeong P.S., Sim B.W., Park S.H., Kim M.J., Kang H.G., Nanjidsuren T., Lee S., Song B.S., Koo D.B., Kim S.U. (2020). Chaetocin improves pig cloning efficiency by enhancing epigenetic reprogramming and autophagic activity. *Int. J. Mol. Sci.*, 21: 4836.
- Jin Y.X., Zheng Z., Yu X.F., Zhang J.B., Namgoong S., Cui X.S., Hyun S.H., Kim N.H. (2016). Autophagy and ubiquitin-mediated proteolysis may not be involved in the degradation of spermatozoon mitochondria in mouse and porcine early embryos. *Zygote*, 24: 31–41.
- Kaneko T., Whittingham D.G., Yanagimachi R. (2003). Effect of pH value of freeze-drying solution on the chromosome integrity and developmental ability of mouse spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 68: 136–139.
- Keskintepe L., Eroglu A. (2021). Preservation of Mammalian Sperm by Freeze-Drying. *Methods Mol. Biol.*, 2180: 721–730.
- Kikuchi K., Kaneko H., Nakai M., Somfai T., Kashiwazaki N., Nagai T. (2016). Contribution of in vitro systems to preservation and utilization of porcine genetic resources. *Theriogenology*, 86: 170–175.
- Kropp J., Carrillo J.A., Namous H., Daniels A., Salih S.M., Song J., Khatib H. (2017). Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. *BMC Genomics*, 18: 280.
- Lauvie A., Audiot A., Couix N., Casabianca F., Brives H., Verrier E. (2011). Diversity of rare breed management programs: Between conservation and development. *Livest. Sci.*, 140: 161–170.
- Lee J., Lee Y., Lee G.S., Lee S.T., Lee E. (2019). Comparative study of the developmental competence of cloned pig embryos derived from spermatogonial stem cells and fetal fibroblasts. *Reprod. Domest. Anim.*, 54: 1258–1264.
- Len J.S., Koh W.S.D., Tan S.H. (2019). The roles of reactive oxygen species and antioxidants in cryopreservation. *Biosci. Rep.*, 39: BSR20191601.
- León-Quinto T., Simón M.A., Cadenas R., Martínez A., Serna A. (2014). Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Cryobiology*, 68: 227–233.
- Leroy G., Besbes B., Boettcher P., Hoffmann I., Pilling D., Baumung R., Scherf B. (2016). Factors and determinants of animal genetic resources management activities across the world. *Livest. Sci.*, 189: 70–77.
- Leroy G., Gicquel E., Boettcher P., Besbes B., Furre S., Fernandez J., Danchin-Burge C., Alnahhas N., Baumung R. (2020). Coancestry rate's estimate of effective population size for genetic variability monitoring. *Conservation Genet. Resour.*, 12: 275–283.
- Li M.W., Willis B.J., Griffey S.M., Spearow J.L., Lloyd K.C. (2009). Assessment of three generations of mice derived by ICSI using freeze-dried sperm. *Zygote*, 17: 239–251.
- Magalhães L.C., Cortez J.V., Bhat M.H., Sampaio A.C.N.P.C., Freitas J.L.S., Duarte J.M.B., Melo L.M., Freitas V.J.F. (2020). In vitro development and mitochondrial gene expression

- in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) embryos obtained by interspecific somatic cell nuclear transfer. *Cell. Reprogram.*, 22: 208–216.
- Magata F., Tsuchiya K., Okubo H., Ideta A. (2019). Application of intracytoplasmic sperm injection to the embryo production in aged cows. *J. Vet. Med. Sci.*, 81: 84–90.
- Mara L., Casu S., Carta A., Dattena M. (2013). Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetics. *Anim. Reprod. Sci.*, 138: 25–38.
- Men H., Walters E.M., Nagashima H., Prather R.S. (2012). Emerging applications of sperm, embryo and somatic cell cryopreservation in maintenance, relocation and rederivation of swine genetics. *Theriogenology*, 78: 1720–1729.
- Mercati F., Domingo P., Pasquariello R., Dall’Aglia C., Di Michele A., Forti K., Cocci P., Boiti C., Gil L., Zerani M., Maranesi M. (2020). Effect of chelating and antioxidant agents on morphology and DNA methylation in freeze-drying rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, 55: 29–37.
- Muneto T., Horiuchi T. (2011). Full-term development of hamster embryos produced by injecting freeze-dried spermatozoa into oocytes. *J. Mamm. Ova Res.*, 28: 32–39.
- Natan D., Nagler A., Arav A. (2009). Freeze-drying of mononuclear cells derived from umbilical cord blood followed by colony formation. *PLoS One*, 4: e5240.
- Nguyen H.T., Dang-Nguyen T.Q., Somfai T., Men N.T., Viet Linh N., Xuan Nguyen B., Noguchi J., Kaneko H., Kikuchi K. (2020). Selection based on morphological features of porcine embryos produced by *in vitro* fertilization: Timing of early cleavages and the effect of polyspermy. *Anim. Sci. J.*, 91: e13401.
- Olaciregui M., Luño V., Martí J.I., Aramayona J., Gil L. (2016). Freeze-dried stallion spermatozoa: evaluation of two chelating agents and comparative analysis of three sperm DNA damage assays. *Andrologia*, 48: 900–906.
- Olaciregui M., Luño V., González N., Domingo P., de Blas I., Gil L. (2017). Chelating agents in combination with rosmarinic acid for boar sperm freeze-drying. *Reprod. Biol.*, 17: 193–198.
- Ono T., Mizutani E., Li C., Wakayama T. (2008). Nuclear transfer preserves the nuclear genome of freeze-dried mouse cells. *J. Reprod. Dev.*; 54: 486–491.
- Palazzese L., Gosálvez J., Anzalone D.A., Loi P., Saragusty J. (2018). DNA fragmentation in epididymal freeze-dried ram spermatozoa impairs embryo development. *J. Reprod. Dev.*, 64: 393–400.
- Polak G., Krupiński J., Martyniuk E., Calik J., Kawęcka A., Krawczyk J., Majewska A., Sikora J., Sosin-Bzducha E., Szyndler-Nędzka M., Tomczyk-Wrona I. (2021). The risk status of Polish local breeds under conservation programmes – new approach. *Ann. Anim. Sci.*, 21: 125–140.
- Praxedes É.A., Silva M.B., Oliveira L.R.M., Viana J.V.D.S., Silva A.R., Oliveira M.F., Pereira A.F. (2021). Establishment, characterization, and cryopreservation of cell lines derived from red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) – A study in a wild rodent. *Cryobiology*, 98: 63–72.
- Ramos-Ibeas P., Gimeno I., Cañón-Beltrán K., Gutiérrez-Adán A., Rizos D., Gómez E. (2020). Senescence and apoptosis during *in vitro* embryo development in a bovine model. *Front. Cell Dev. Biol.*, 8: 619902.
- Ressaissi Y., Anzalone D.A., Palazzese L., Czernik M., Loi P. (2021). The impaired development of sheep ICSI derived embryos is not related to centriole dysfunction. *Theriogenology*, 159: 7–12.
- Rodríguez M.B., Gambini A., Clérico G., Ynsaurralde-Rivolta A.E., Briski O., Largel H., Sansinena M., Salamone D.F. (2019). Time of first polar body extrusion affects the developmental competence of equine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Reprod. Fertil. Dev.*, 31: 1805–1811.

- Ryder O.A., Onuma M. (2018). Viable Cell Culture Banking for Biodiversity Characterization and Conservation. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 6: 83–98.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2021). Extranuclear Inheritance of Mitochondrial Genome and Epigenetic Reprogrammability of Chromosomal Telomeres in Somatic Cell Cloning of Mammals. *Int. J. Mol. Sci.*, 22: 3099.
- Samiec M., Romanek J., Lipiński D., Opiela J. (2019). Expression of pluripotency-related genes is highly dependent on trichostatin A-assisted epigenomic modulation of porcine mesenchymal stem cells analysed for apoptosis and subsequently used for generating cloned embryos. *Anim. Sci. J.*, 90: 1127–1141.
- Samiec M., Wiater J., Wartalski K., Skrzyszowska M., Trzcńska M., Lipiński D., Jura J., Smoraż Z., Słomski R., Duda M. (2022). The Relative Abundances of Human Leukocyte Antigen-E, α -Galactosidase A and α -Gal Antigenic Determinants Are Biased by Trichostatin A-Dependent Epigenetic Transformation of Triple-Transgenic Pig-Derived Dermal Fibroblast Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 23: 10296.
- Sampaio R.V., Sangalli J.R., De Bem T.H.C., Ambrizi D.R., Del Collado M., Bridi A., de Ávila A.C.F.C.M., Macabelli C.H., de Jesus Oliveira L., da Silveira J.C., Chiaratti M.R., Perecin F., Bressan F.F., Smith L.C., Ross P.J., Meirelles F.V. (2020). Catalytic inhibition of H3K9me2 writers disturbs epigenetic marks during bovine nuclear reprogramming. *Sci. Rep.*, 10: 11493.
- Saragusty J., Loi P. (2019). Exploring dry storage as an alternative biobanking strategy inspired by Nature. *Theriogenology*, 126: 17–27.
- Silyukova Y.L., Stanishevskaya O.I., Dementieva N.V. (2020). The current state of the problem of in vitro gene pool preservation in poultry. *Vavilovskii Zhurnal Genet. Seleksii*, 24: 176–184.
- Smits K., Hoogewijs M., Woelders H., Daels P., Van Soom A. (2012). Breeding or assisted reproduction? Relevance of the horse model applied to the conservation of endangered equids. *Reprod. Domest. Anim.*, 47: 239–248.
- Soglia D., Sartore S., Lasagna E., Castellini C., Cendron F., Perini F., Cassandro M., Marzoni M., Iaffaldano N., Buccioni A., Dabbou S., Castillo A., Maione S., Bianchi C., Profiti M., Sacchi P., Cerolini S., Schiavone A. (2021). Genetic Diversity of 17 Autochthonous Italian Chicken Breeds and Their Extinction Risk Status. *Front. Genet.*, 14: 715656.
- Son Y.B., Jeong Y.I., Jeong Y.W., Yu X., Cai L., Choi E.J., Hossein M.S., Tinson A., Singh K.K., Rajesh S., Noura A.S., Hwang W.S. (2021). Vitrification of camel skin tissue for use as a resource for somatic cell nuclear transfer in *Camelus dromedarius*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 57: 487–492.
- Song W.H., Zuidema D., Yi Y.J., Zigo M., Zhang Z., Sutovsky M., Sutovsky P. (2021). Mammalian Cell-Free System Recapitulates the Early Events of Post-Fertilization Sperm Mitophagy. *Cells*, 10: 2450.
- Sun Y., Li Y., Zong Y., Mehaisen G.M.K., Chen J. (2022). Poultry genetic heritage cryopreservation and reconstruction: advancement and future challenges. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 13: 115.
- Takeda K. (2019). Functional consequences of mitochondrial mismatch in reconstituted embryos and offspring. *J. Reprod. Dev.*, 65: 485–489.
- Takeda K., Kobayashi E., Nishino K., Imai A., Adachi H., Hoshino Y., Iwao K., Akagi S., Kaneda M., Watanabe S. (2019). Age-related changes in DNA methylation levels at CpG sites in bull spermatozoa and *in vitro* fertilization-derived blastocyst-stage embryos revealed by combined bisulfite restriction analysis. *J. Reprod. Dev.*, 65: 305–312.
- Thiangthientham P., Kallayanathum W., Anakkul N., Suwimonteerabutr J., Santiviparat S., Techakumphu M., Loi P., Tharasanit T. (2023). Effects of freeze-drying on the quality and

- fertilising ability of goat sperm recovered from different parts of the epididymis. *Theriogenology*, 195: 31–39.
- Trzcińska M., Bryła M. (2015). Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Pol. J. Vet. Sci.*, 18: 473–480.
- Trzcińska M., Bryła M., Gajda B., Gogol P. (2015). Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology*, 83: 307–313.
- Tsai T.S., St. John J.C. (2018). The effects of mitochondrial DNA supplementation at the time of fertilization on the gene expression profiles of porcine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 85: 490–504.
- Ushigome N., Wakayama S., Yamaji K., Ito D., Ooga M., Wakayama T. (2022). Production of offspring from vacuum-dried mouse spermatozoa and assessing the effect of drying conditions on sperm DNA and embryo development. *J. Reprod. Dev.*, 68: 262–270.
- Wakayama S., Ito D., Hayashi E., Ishiuchi T., Wakayama T. (2022). Healthy cloned offspring derived from freeze-dried somatic cells. *Nat. Commun.*, 13: 3666.
- Wang X., Qu J., Li J., He H., Liu Z., Huan Y. (2020). Epigenetic reprogramming during somatic cell nuclear transfer: recent progress and future directions. *Front. Genet.*, 11: 205.
- Wiater J., Samiec M., Wartalski K., Smoraż Z., Jura J., Słomski R., Skrzyszowska M., Romek M. (2021). Characterization of Mono- and Bi-Transgenic Pig-Derived Epidermal Keratinocytes Expressing Human *FUT2* and *GLA* Genes – In Vitro Studies. *Int. J. Mol. Sci.*, 22: 9683.
- Woelders H., Windig J., Hiemstra S.J. (2012). How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (farm) animals. *Reprod. Domest. Anim.*, 47: 264–273.
- Wood K.A., Stilman R.A., Hilton G.M. (2018). Conservation in a changing world needs predictive models. *Anim. Conserv.*, 21: 87–88.
- Wu S., Li X., Huang G., Guo J., Zhang X., Liao L., Zhi W., Li K., Wang Y., Chu Z., Shang L., Yu X., Yu K., Xu W. (2023). Dissecting Sperm Mitochondrial G-Quadruplex Structures Using a Fluorescent Probe Biomarker to Monitor and Regulate Fertilization Capability. *ACS Sens.*, 8: 2186–2196.
- Yeste M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85: 47–64.
- Zhang M., Oldenhof H., Sydykov B., Bigalk J., Sieme H., Wolkers W.F. (2017). Freeze-drying of mammalian cells using trehalose: preservation of DNA integrity. *Sci. Rep.*, 7: 6198.
- Zhang L., Zhang Y., Han Z., Fang J., Chen H., Guo Z. (2019). Transcriptome analyses reveal effects of vitamin C-treated donor cells on cloned bovine embryo development. *Int. J. Mol. Sci.*, 20: 2628.
- Zhang X., Gao S., Liu X. (2021). Advance in the Role of Epigenetic Reprogramming in Somatic Cell Nuclear Transfer-Mediated Embryonic Development. *Stem Cells Int.*, 6681337.
- Zuidema D., Sutovsky P. (2020). The domestic pig as a model for the study of mitochondrial inheritance. *Cell Tissue Res.*, 380: 263–271.
- Zuo Z., Niu Z., Liu Z., Ma J., Qu P., Qiao F., Su J., Zhang Y., Wang Y. (2020). The effects of glycine-glutamine dipeptide replaced L-glutamine on bovine parthenogenetic and IVF embryo development. *Theriogenology*, 141: 82–90.

**APPLYING THE MODERN METHODS OF REPRODUCTIVE BIOTECHNOLOGY
TO THE *EX SITU* CONSERVATION OF NATIONAL BREEDS OF SELECTED
LIVESTOCK SPECIES**

Monika Trzcńska, Marcin Samiec

SUMMARY

This article presents a comprehensive biological and zootechnical characterization of innovative methods of long-term preservation of biological material and reproductive and embryological biotechnology used for *ex situ* conservation of native breeds of selected livestock species, with particular emphasis on the importance of the National Research Institute of Animal Production in Balice, Poland in this area. The development of biotechnology-assisted *ex situ* conservation programs provides not only the opportunity for restoration, but also for the perpetuation of sustainable biodiversity, which underlies intra-/inter-population genotypic and phenotypic variability in domestic livestock subpopulations.

Key words: cryopreservation, freeze-drying, reproductive biotechnology, embryological biotechnology, *ex situ* conservation, livestock species, endangered native breeds