

## Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 56, No 1 (2005)



### Current research in rabbit biotechnology

E. XYLOURI (Ε. ΞΥΛΟΥΡΗ)

doi: [10.12681/jhvms.15067](https://doi.org/10.12681/jhvms.15067)

### To cite this article:

XYLOURI (Ε. ΞΥΛΟΥΡΗ) Ε. (2017). Current research in rabbit biotechnology. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 56(1), 32–38. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15067>

## Σύγχρονη έρευνα στη βιοτεχνολογία του κουνελιού

Ε. Ξυλούρη

**ΠΕΡΙΛΗΨΗ.** Η ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας έχει ανοίξει νέους ορίζοντες στον τρόπο διαχείρισης και εκτροφής των αγροτικών ζώων. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι μια αδρή παρουσίαση των νέων βιοτεχνολογικών επεμβάσεων που βρίσκουν εφαρμογή στο κουνέλι. Μετά την αξιολόγηση της σημασίας του κουνελιού στην επιστημονική έρευνα, περιγράφονται τα στάδια και οι μέθοδοι μεταφοράς εμβρύων σε αυτό, καθώς και διάφορες πειραματικές μελέτες για τη σύγκριση των εκάστοτε χρησιμοποιούμενων μεθόδων. Ακολουθεί συνοπτική περιγραφή της *in vitro* γονιμοποίησης, τεχνικής που μπορεί να συνδυαστεί με τη μεταφορά εμβρύων. Η παραγωγή διαγονιδιακών ζώων περιλαμβάνει τη μεταφορά εμβρύων ως ενδιάμεσο στάδιο. Έτσι, παρουσιάζονται όλα τα στάδια της τεχνικής, ενώ γίνεται αναφορά σε μελέτες παραγωγής διαγονιδιακών κουνελιών.

**Λέξεις ευρετηρίασης:** κουνέλι, μεταφορά εμβρύων, διαγονιδιακά

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αξιοποίηση του κουνελιού (*Oryctolagus cuniculus*) παρουσιάζει διπλό ενδιαφέρον ως παραγωγικό και ως ζώο του εργαστηρίου χάρη στο μικρό του μέγεθος, την ταχυαυξητική του ικανότητα, το χαμηλό κόστος διατροφής του, την εύκολη διαχείριση, την προσαρμοστικότητά του στις τεχνητές συνθήκες εκτροφής, την πολυδυμία και το σύντομο αναπαραγωγικό του κύκλο (McNitt et al., 1996).

Ως παραγωγικό ζώο αξιοποιείται για την παραγωγή κρέατος, γούνας και μαλλιού. Στα πλαίσια των ζωοτεχνικών επεμβάσεων που τροποποιούν τις αποδόσεις στο κουνέλι, όπως και σε άλλα είδη ζώων (χοίρος, μηρυκαστικά), εφαρμόζεται μεταφορά εμβρύων, *in vitro* γονιμοποίηση και μεταφορά γονιδίων (Milan et al., 2000).

Ως πειραματόζωο και πρότυπο μελέτης νοσημάτων για τον άνθρωπο χρησιμοποιείται για την παραγωγή αντισωμάτων και θεραπευτικών ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (Fan et al., 1999, Bozse et al., 2003), μελέτη της αθη-

## Current research in rabbit biotechnology

Xylouri E.

**ABSTRACT.** The advance of biotechnology has created new methods in breeding farm animals. The purpose of the present study is the description and evaluation of the new technological techniques that are applied to rabbits. Following the contribution of rabbit to the scientific research, there is a detailed description of embryo transfer in rabbits. Several experimental studies are presented in order to compare the different methods that can be used. There is a brief description of *in vitro* fertilization in rabbits, a technique that can be combined with embryo transfer. The production of transgenic animals includes embryo transfer. This is the reason why each step of it is described separately, while studies referring to transgenic rabbits are presented.

**Key words:** rabbit, embryo transfer, transgenic

ρωμάτωσης, της υπερχοληστεριναιμίας (Mortensen et al., 1994), της καρκινογένεσης σε συνδυασμό με τη μόλυνση με ιούς Παπιλλώμα κ.λπ. (Breitburd et al., 1997).

Για τους παραπάνω λόγους η έρευνα που γίνεται για την ανάλυση του γονιδιώματος στο κουνέλι είναι πολύ σημαντική και με αξιόλογα αποτελέσματα, όσον αφορά στην παραγωγή γενετικών χαρτών με μικροδορυφόρους (Queney et al., 2001) και τον προσδιορισμό της θέσης των τελευταίων στα αντίστοιχα χρωματοσώματα του ζώου (Fox et al., 1994, Korstanje et al., 1999, Rogel-Gaillard et al., 2001, Zijlstra et al., 2002, Hayes et al., 2002, Chantry-Darmon et al., 2004).

## Τα στάδια της μεταφοράς εμβρύων

Η επιτυχία της μεταφοράς εμβρύων προϋποθέτει τη διεξαγωγή της:

**1) Επιλογής των δοτών εμβρύων** με κριτήρια τη γενετική υπεροχή, την κανονική, φυσιολογική και υγιεινή



κατάσταση, το φυσιολογικό στάδιο αναπαραγωγής, την ηλικία, τη φυλή, την οικονομική αξία των απογόνων.

**2) Πρόκλησης υπερωοθυλακιορρηξίας** που είναι περιοριστικός παράγοντας (Maurer et al., 1968a, Maurer et al., 1968b, Hagen, 1974, Smidt and Nieman, 1989, Carney et al., 1990, Kauffman et al., 1998, Saratsi A. et al., 2002).

**3) Χειρουργικής συλλογής εμβρύων** με μεσοκοιλιακή τομή και έκπλυση του ωαγωγού ή των κεράτων της μήτρας και πιο πρόσφατα με λαπαροσκόπηση (Besenfelder and Brem, 1993).

**4) Αξιολόγηση των εμβρύων** με: α) Μορφολογική εκτίμηση ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης, το σχήμα, το χρώμα, το μέγεθος του περιεκυθικού χώρου και τη διάφανη ζώνη, β) Με μεθόδους χρώσεως, γ) *In vitro* καλλιέργεια. Για την καλλιέργεια σημαντικό ρόλο παίζει το καλλιεργητικό θρεπτικό μέσο. Πολλές προσμίξεις στα θρεπτικά υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί, μεταξύ των οποίων το: Epidermal growth factor (EGF, 10ng/ml) insulin (5μg/ml) transferrin (5μg/ml) sodium selenite (μg/ml)= BSEITS medium, με σημαντική επιτυχία στην ανάπτυξη των ζυγωτών και των εμβρύων (Chreneck et al., 1998). δ) Εκτίμηση των εμβρύων μετά τη μεταφορά σε απολινωμένους ωαγωγούς (Smidt and Niemann, 1989).

**5) Προαιρετική κρυοδιατήρηση εμβρύων** άριστης ποιότητας και του σωστού σταδίου ανάπτυξης. Κατά την κατάψυξη-απόψυξη είναι πιθανή η αλλοίωση των εμβρύων, γι' αυτό χρησιμοποιείται κρυοπροστασία (Hafez, 1993).

**6) Επιλογή των δεκτών εμβρύων** με βάση τη φυσιολογική, υγιεινή, αναπαραγωγική τους κατάσταση, το συγχρονισμό οίστρου μεταξύ δότη και δέκτη (Schmidt et al., 1992) και τη συμβατότητα ως προς το μέγεθος του εμβρύου (Smidt and Niemann, 1989, Ypsilantis et al., 1996).

**7) Μεταφορά εμβρύων** χειρουργικά, συνήθως με αναισθητοποίηση και μεσοκοιλιακή λαπαροτομή ή πλευρικές-οσφυϊκές προσεγγίσεις που αφήνουν το γεννητικό σύστημα εκτεθειμένο (Hafez, 1993).

### Μέθοδοι μεταφοράς εμβρύων στα κουνέλια

Το 1880 πρώτος ο Schenk ανέφερε την προσπάθειά του να καλλιεργήσει έμβρυα θηλαστικών και ιδιαίτερα κουνελιών *in vitro*. Παρατήρησε την αυλάκωση (cleavage) μετά από τη γονιμοποίηση του ωαρίου με το σπερματοζωάριο (Schenk, 1880). Το 1893 ο Onanoff ανέφερε την *in vitro* γονιμοποίηση ωοκυττάρων κουνελιών και ινδικών χοιριδίων (Onanoff, 1893). Ισχυρίστηκε, επίσης, ότι τα έμβρυα έφθασαν μέχρι το στάδιο των 8-κυττάρων *in vitro* και η περαιτέρω ανάπτυξή τους επιτεύχθηκε μετά από τη μεταφορά τους στην κοιλιακή κοιλότητα θηλέων και αρρένων ατόμων. Οι αρχικές αυτές αναφορές των Schenk και Onanoff έγιναν ρουτίνα μόνο κατά τις τελευταίες δεκαετίες σε άλλα είδη θηλαστικών, κατά το τέλος του 20ου με αρχές του 21ου αιώνα.

Στη συνέχεια, ο Brachet το 1912 περιέγραψε πρώτος τη συμπεριφορά κατά την καλλιέργεια των βλαστοκύστε-

ων κουνελιών (Brachet το 1912).

Μετά την πρώτη επιτυχή μεταφορά εμβρύων στα κουνέλια από τον Walter Heape το 1891, ακολούθησαν αρκετές προσπάθειες για τη χειρουργική προσέγγιση των ωοθηκών, των ωαγωγών, της μήτρας και του κόλπου από τους κενεώνες. Όμως προκαλούσαν καταπόνηση, αιμορραγία και μορφολογική αλλοίωση των αναπαραγωγικών οργάνων.

Το 1969 ο Testart εφάρμοσε την κολπική μεταφορά εμβρύων. Μία ενδοσκοπική τεχνική εφαρμόστηκε από τον Fujimoto το 1974 (Besenfelder and Brem, 1993). Το 1977 και 1988 επιτεύχθηκε η κολπική συλλογή εμβρύων (Besenfelder et al., 1998). Το 1987 μεταφέρθηκαν με λαπαροτομή έμβρυα 2 κυττάρων, 16-32 κυττάρων και μοριδίου στους ωαγωγούς 5 δεκτών. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η λαπαροσκοπική τεχνική δεν είχε αρνητικές επιδράσεις στη βιωσιμότητα των εμβρύων (Besenfelder and Brem, 1993).

### Λαπαροσκοπική μεταφορά εμβρύων

Σκοπός του εγχειρήματος ήταν η ανάπτυξη μιας νέας διαδικασίας μεταφοράς εμβρύων στους ωαγωγούς των κουνελιών με τη χρήση ενδοσκοπίου. Σε πρώτη φάση μεταφέρθηκε μεγάλος αριθμός εμβρύων, ενώ σε δεύτερη φάση ο αριθμός μειώθηκε βελτιώνοντας το ποσοστό γονιμότητας. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου ήταν: α) απουσία οργανικής αλλοίωσης, β) πολλαπλή χρησιμοποίηση των δεκτών, γ) μείωση του χρόνου μεταφοράς, δ) μείωση των πιθανοτήτων τραυματισμών στο δέρμα (Besenfelder and Brem, 1993).

### Τεχνητή γονιμοποίηση και μεταφορά εμβρύων

Εκτιμήθηκαν οι επιπτώσεις της ενδοσκοπικής μεταφοράς εμβρύων στην εγκυμοσύνη και στο μέγεθος της τοκετοομάδας, συγκριτικά με στοιχεία από τεχνητώς γονιμοποιημένες κουνέλες. Αρχικά, μεταφέρθηκαν ενδοσκοπικά αμφοτερόπλευρα 4-12 έμβρυα για να διαπιστωθεί ποιος αριθμός οδηγεί σε εγκυμοσύνη και μεγάλη τοκετοομάδα. Το ποσοστό εγκυμοσύνης ήταν 81%. Όταν η τεχνητή γονιμοποίηση και η μεταφορά εμβρύων έγιναν εναλλακτικά, διαπιστώθηκαν τα εξής: 1) Η μεταφορά εμβρύων πέτυχε τουλάχιστον τα ίδια ποσοστά εγκυμοσύνης με την τεχνητή γονιμοποίηση (Wettemann and Hafs, 1970), 2) η μεταφορά επαναλήφθηκε χωρίς μείωση της γονιμότητας (Illera et al., 1990) ή προβλήματα εμβρυϊκής εμφύτευσης (Besenfelder et al., 1997).

### Ενδοσκοπική συλλογή και μεταφορά εμβρύων

Εφαρμόστηκε ενδοσκοπική κολπική μεταφορά εμβρύων μετά τη λαπαροσκοπική συλλογή τους από τον κόλπο και παρατηρήθηκαν τα εξής: 1) Αντίθετα από τον Testart, που το 1969 ανέφερε ένα ποσοστό μόλυνσης 30%, δε σημειώθηκαν μητρίκες ή κολπικές μολύνσεις, 2) Η μέθοδος αρμόζει για τη συλλογή εμβρύων που βρίσκονται στον ωαγωγό ή στη μήτρα (Besenfelder et al., 1998).



### Προοπτικές για την εφαρμογή της μεταφοράς εμβρύων

Η εφαρμογή της μεταφοράς εμβρύων στη Ζωική Παραγωγή έχει αρκετά πλεονεκτήματα: 1) Καλύτερη αξιοποίηση του αναπαραγωγικού δυναμικού των θηλυκών, διότι επιτρέπει την απόκτηση απογόνων από πολύτιμους δότες. 2) Την εισαγωγή-εξαγωγή γενετικού υλικού. 3) Συντομότερο έλεγχο της παρουσίας υπολειπόμενων γονιδίων και μειωμένο διάστημα γενεών. 4) Ανάπτυξη τεχνικών κρυοδιατήρησης γονιδιακού υλικού. 5) Παραγωγή διδύμων. 6) Εισαγωγή νέων γονιδίων σε κλειστούς πληθυσμούς. 7) Μεταφορά γονιδίων. 8) Κλωνοποίηση από σωματικά κύτταρα (Chesne et al., 2002). Προς το παρόν έχει περιορισμένη εφαρμογή λόγω των προϋποθέσεων επιτυχίας της, όπως είναι η διαθεσιμότητα θηλυκών δοτών και δεκτών, η χρήση της τεχνητής σπερματέγχυσης, (Battaglini et al., 1982), η διατήρηση εμβρύων *in vitro* (Fischer, 1987), οι κατάλληλα σχεδιασμένες συζεύξεις, ο έλεγχος των αποδόσεων και η διαθεσιμότητα επισημονικής γνώσης και εργαστηριακού εξοπλισμού (Smidt and Niemann, 1989).

### Η *in vitro* γονιμοποίηση

Για την *in vitro* γονιμοποίηση ωαρίων κουνελιού πραγματοποιούνται τα ακόλουθα στάδια: 1) Λήψη και αποθήκευση ωοθηκικού υγρού, 2) λήψη και αποθήκευση υγρού με σπερματοζωάρια από τη μητρική κοιλότητα (Bedford 1970, Boussit, 1989, Theau-Clement and Roustan, 1991), 3) συλλογή ωαρίων μετά από έκπλυση των ωοθηκών με το ωοθηκικό υγρό, 4) ανάμειξη των ωαρίων με σπερματοζωάρια (Suzuki, 1974). Ο συνδυασμός της *in vitro* γονιμοποίησης και της μεταφοράς εμβρύων έχει καταλήξει στη γέννηση ζωντανών απογόνων για διάφορα ζωικά είδη και επιτρέπει την επαναλαμβανόμενη χρήση αξιολογών δοτών για την παραγωγή πολλών ωοκυττάρων. Τα πλεονεκτήματά της είναι: 1) Η ανάκτηση ωαρίων από ζώα που μόλις έχουν πεθάνει ή σφαγεί και η μείωση του διαστήματος γενεών, με τη συλλογή ωαρίων από θηλυκά σε προηβική ηλικία. 2) Ένα πρόγραμμα γενετικής επιλογής σε συνδυασμό με την *in vitro* γονιμοποίηση και μεταφορά εμβρύων μπορεί να μειώσει την υπογονιμότητα λόγω θερμικής καταπόνησης. 4) Έμβρυα με άθικτη τη διάφανη ζώνη δε μετέδωσαν βακτηριολογικής ή ιογενούς αιτιολογίας νοσήματα, κάνοντας πιθανή τη χρήση εμβρύων “μολυσμένων ζώων” και τον έλεγχο των παθογόνων μέσω της μεταφοράς εμβρύων. 5) Μείωση του κόστους της μεταφοράς εμβρύων (Smidt and Niemann, 1989). Ωστόσο, πρόκειται για τεχνική με αυξημένο κόστος, με χαμηλά ποσοστά επιτυχίας, ενώ υπάρχουν ανησυχίες για πιθανές ανωμαλίες στους απογόνους (Bourdon, 1997).

### Μέθοδοι μεταφοράς γονιδίων στα αγροτικά ζώα

Η ενσωμάτωση ξένων γονιδίων στο γονιδίωμα ενός ζώου μετατρέπεται το εν λόγω ζώο σε διαγονιδιακό. Οι μέθοδοι παραγωγής διαγονιδιακών ζώων είναι οι ακόλουθες: 1) Μικροένεση DNA σε έμβρυα, ώστε τα παραγό-

μενα κύτταρα και τα γαμετικά να φέρουν τα ξένα γονίδια (Chrenek et al., 2004). 2) Χρήση ρετροϊκών υποδοχέων. Το RNA του ρετροϊού, αφού εισαχθεί σε ένα κύτταρο, υφίσταται αντίστροφη μεταγραφή σε DNA. Το δίκλωνο DNA ενσωματώνεται ως ένα αντίγραφο στο γονιδίωμα του κυττάρου και βάσει αυτού συντίθεται το ιικό DNA και πρωτεΐνες από τα ένζυμα του κυττάρου. Η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί στα εξής σημεία: α) Μέχρι και το 100% των κυττάρων μπορεί να εκφράσει τα ξένα γονίδια, β) είναι δυνατή η ταυτόχρονη “μόλυνση” πολλών κυττάρων, γ) το DNA μπορεί να ενσωματωθεί ως ένα αντίγραφο σε μία τυχαία θέση του κυτταρικού γονιδιώματος, δ) παρ' όλο που η ενσωμάτωση είναι τυχαία ως προς το κυτταρικό γονιδίωμα, είναι ακριβής ως προς το ιικό, ε) συνήθως δε βλάπτει τα κύτταρα. Όμως η μεταφορά ξένου DNA είναι περιορισμένη, ενώ οι ρετροϊκές αλληλουχίες μπορεί να υπερκαλύπτουν τη διαγονιδιακή έκφραση. 3) Χρήση αργέονων εμβρυϊκών κυττάρων που διατηρούνται αδιαφοροποίητα σε καλλιέργεια. Αν επανεισασχθούν σε έμβρυο στο στάδιο της βλαστοκύστης ενσωματώνονται σε αυτό και συμβάλλουν στη δημιουργία όλων των κυτταρικών τύπων κατά την ανάπτυξη. Μπορούν να επιλεγθούν και να ελεγχθούν ως προς τον αριθμό των παραγόμενων αντιγράφων και την πιθανή έκφραση των ξένων γονιδίων, ενώ απενεργοποιούν ενδογενή γονίδια αποκλύπτοντας το λειτουργικό τους ρόλο. Όμως, η διάθεση των ανασυνδυασμένων απογόνων απαιτεί την πάροδο μιας γενιάς (Smidt and Niemann, 1989).

### Τα στάδια μικροένεσης DNA για την παραγωγή διαγονιδιακών κουνελιών

Η ευκολία παραγωγής διαγονιδιακών ζώων εξαρτάται από τις ιδιαιτερότητες κάθε είδους με καθοριστικό παράγοντα το διάστημα γενεών. Για την αγελάδα απαιτείται πάροδος 7 ετών μέχρι τη χρησιμοποίηση των διαγονιδιακών ατόμων στην παραγωγή. Γι' αυτό προτιμώνται ζώα με μικρό διάστημα γενεών, όπως το κουνέλι (Hammer et al., 1985, Chrenek et al., 2004). Η μικροένεση συνιστά την πιο εύχρηστη διαδικασία μεταφοράς γονιδίων με τα παρακάτω στάδια:

**1) Επιλογή του προς μεταφορά γονιδίου** για τη βελτίωση της αξίας των ζώων. Οι σημαντικότερες ιδιότητες των ζώων ελέγχονται από πλήθος γονιδίων με προσθετική επίδραση, γι' αυτό δεν υποβάλλονται άμεσα σε χειρισμό. Υπάρχουν ιδιότητες που ελέγχονται από ένα μόνο γονίδιο, π.χ. το γονίδιο της αλλοθάνης των χοίρων. Γι' αυτό η μεταφορά περιορίζεται σε γονίδια με θετική δράση στα ζώα, όπως: α) Γονίδια που κωδικοποιούν ενδοκρινείς ή αυτοκρινείς λειτουργίες, π.χ. το γονίδιο της αυξητικής ορμόνης. Όμως, ο έλεγχος μιας ιδιότητας, όπως η ανάπτυξη, ίσως επιδρά δυσμενώς σε κάποια άλλη, όπως η αναπαραγωγή. β) Γονίδια που κωδικοποιούν ένζυμα για την αύξηση του ρυθμού μετατροπής του υποστρώματος σε προϊόν με την εισαγωγή νέων βιοχημικών οδών. γ) Γονίδια που αυξάνουν την αντοχή σε ασθένειες. δ) Γονίδια που ελέγχουν ζωοκομικά προϊόντα. Στο γάλα θα ήταν



επιθυμητή η εισαγωγή αλληλουχιών για την κωδικοποίηση βελτιωμένων πρωτεϊνών με στόχο, π.χ. το γενετικό περιορισμό των όξινων πρωτεϊνών α-λακταλβουμίνης και β-λακτογλοβουλίνης (Smidt and Niemann, 1989)

**2) Απομόνωση του γονιδίου από το DNA κατάλληλου ιστού και επώαση με το κατάλληλο ένζυμο περιορισμού.**

**3) Κλωνοποίηση του γονιδίου:** Ένα γονίδιο παρέχει όλα τα στοιχεία που ελέγχουν την έκφραση μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Ένα τυπικό ευκαρυωτικό γονίδιο αποτελείται από τρεις περιοχές: α) Περιοχή υποκινητή, που προσδιορίζει τον ιστό, το χρόνο και την ποσότητα της επικείμενης αντιγραφής, β) Δομική περιοχή γονιδίου, γ) Περιοχή ακολουθιών που ρυθμίζουν τη μεταγραφή και τη μετάφραση στο 3'-άκρο του γονιδίου. Για ένα άριστο σχέδιο μεταφοράς γονιδίων επιδιώκεται ο όσο το δυνατόν ευρύτερος συνδυασμός των κωδικοποιημένων αλληλουχιών με τα άκρα 5' και 3', ενώ η γραμμική μορφή του DNA επιτρέπει την καλύτερη αντιγραφή. Ακόμα είναι απαραίτητη η απομάκρυνση προκαρυωτικών, λόγω κλωνοποίησης αλληλουχιών που έχουν παρεμποδιστική δράση. Επίσης, τα γονίδια θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με την αυθεντική δομή τους παρά με τη μορφή του cDNA τους. Φαίνεται ότι η δομή των εξόνων-ιντρονίων αυξάνει την αποτελεσματικότητα αντιγραφής των μεταφερθέντων γονιδίων.

**4) Δημιουργία του κατάλληλου γονιδιακού συνδυασμού από την ανάμειξη τεμαχίων περιορισμού που έχουν παραχθεί με τη δράση του ίδιου ενζύμου. Τα τεμάχια συναρμολογούνται σε ένα μόριο ανασυνδυασμένου DNA μέσω υδρογονικών δεσμών και της DNA συνθετάσης.**

**5) Προετοιμασία του διαλύματος "DNA":** Τα γονίδια αναπαράγονται ως πλασμίδια ή κοσμίδια και τα υπερηλεκτρομμένα μόρια απομονώνονται από βακτηριακές καλλιέργειες. Με τη δράση ενδονουκλεασών λαμβάνονται γραμμικά μόρια DNA και προστίθενται στο διάλυμα έγχυσης.

**6) Συλλογή, *in vitro* διατήρηση των ζυγωτών:** Μετά την ορμονική πρόκληση ωοθυλακιορρηξίας ακολουθεί φυσική ή τεχνητή γονιμοποίηση των θηλυκών. Τα ζυγωτά πρέπει να αφαιρεθούν από τους ωαγωγούς περίπου 12-24 ώρες μετά τη γονιμοποίηση και να διατηρηθούν σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό κυτταροκαλλιέργειας, όπως έχουν μελετήσει διάφοροι ερευνητές (Chrenek et al., 1998).

**7) Μικροένεση του γονιδιακού συνδυασμού στον αρσενικό προπυρήνα του ζυγωτού:** Η μικρο - πιπέτα με το διάλυμα "DNA" εισάγεται με μικροένεση στη διάφανη ζώνη, κάτω από παρατήρηση σε ειδικό μικροσκόπιο. Το υλικό προσροφάται ελαφρώς και οδηγείται στον αρσενικό προπυρήνα, ο οποίος στο τέλος μπορεί να έχει διογκωθεί κατά 50%. Τα ζυγωτά, στα οποία έγινε μικροένεση, μεταφέρονται στα ειδικά δοχεία κυτταροκαλλιέργειας (Yang et al., 1992).

**8) Μεταφορά των εμβρύων που προέκυψαν από μικροένεση:** Τα ζυγωτά που έχουν επιβιώσει μεταφέρονται

στους ωαγωγούς σε κουνέλες - δέκτες που έχουν υποστεί συγχρονισμό.

**9) Ανίχνευση των διαγονιδιακών ζώων:** Για την ανίχνευση των διαγονιδιακών ζώων εφαρμόζονται αναλύσεις του DNA.

**10) Καθιέρωση διαγονιδιακών σειρών:** Πρέπει τα γαμετικά κύτταρα του πρωταρχικού διαγονιδιακού ζώου, του ιδρυτή, να φέρουν αντίγραφα των γονιδίων που εισήχθησαν μέσω μικροένεσης.

**11) Έλεγχος της έκφρασης των ξένων γονιδίων:** Η έκφραση των ξένων γονιδίων εμφανίζεται σε επίπεδο RNA και πρωτεΐνης με καθιερωμένες τεχνικές, όπως είναι η ανάλυση τύπου Northern, καθώς και η ανοσολογική ανίχνευση των ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών (Smidt and Niemann, 1989).

## ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΩΝ

### Α) Παραγωγή ξένων πρωτεϊνών στο μαστικό αδένά διαγονιδιακών κουνελιών

Υπάρχει μια ποικιλία πρωτεϊνών απαραίτητων για διαγνωστικούς και θεραπευτικούς σκοπούς, που συνήθως δε διατίθεται σε ικανοποιητική ποιότητα και ποσότητα. Η απομόνωσή τους από το αίμα, σωματικά υγρά δοτών ή όργανα πτωμάτων παρέχει μικρή ποσότητα, ενέχει τον κίνδυνο μετάδοσης μολυσματικών παραγόντων και τη δυσκολία της εύρεσης των πηγών προέλευσής τους.

Έχουν παρασκευαστεί χημικά, πεπτίδια με βραχείες αλυσίδες αμινοξέων, η χρήση των οποίων έχει ανεπαρκή αποτελέσματα. Η υπερπαραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών σε βακτήρια ή ζύμες με μικρό κόστος μειώνει τη βιολογική δράση των πρωτεϊνών ή οδηγεί σε αδιάλυτο προϊόν που συσσωρεύεται στο κυτταρόπλασμα. Γι' αυτό καθιερώθηκαν ανώτερα ευκαρυωτικά συστήματα παραγωγής πρωτεϊνών σε γενετικώς διαφοροποιημένα ανθρώπινα και ζωικά κύτταρα. Ακόμα και τότε είναι απαραίτητη η ρύθμιση και ο προσδιορισμός της αποδοτικότητας της μεταγραφής-μετάφρασης, καθώς και η πρωτεϊνική σταθερότητα. Μειονέκτημα συνιστά το υψηλό κόστος, η πιθανή μόλυνση από ιούς και η ανεπαρκής διεξαγωγή τροποποιήσεων που ακολουθούν τη μετάφραση.

Η δημιουργία διαγονιδιακών ζώων είναι εναλλακτική μέθοδος για την παραγωγή φαρμακευτικών πρωτεϊνών σε ζωικά όργανα ή σωματικά υγρά, με βασικό πλεονέκτημα τη μεγαλύτερη ακρίβεια και αποτελεσματικότητα, ενώ το κόστος της είναι μικρότερο. Το κριτήριο επιλογής των καταλληλότερων ειδών για την παραγωγή ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών αφορά στην απαιτούμενη ποσότητά τους ανά έτος. Τα βοοειδή μπορούν να παράγουν πρωτεΐνες σε τόνους ανά έτος, τα αιγοπρόβατα σε εκατοντάδες κιλά ανά έτος και τα κουνέλια σε κιλά ανά έτος. Το πιο ενδιαφέρον όργανο παραγωγής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών είναι ο μαστικός αδένας, γιατί παρουσιάζει καθημερινή έκκριση πρωτεϊνών, ενώ το γάλα αποτελεί εύκολα συλλεγόμενο προϊόν υπό άριστες συνθήκες υγιεινής. Η έκφραση ξένων πρωτεϊνών στο μαστικό αδένά



κουνελιών έχει επιτευχθεί για τις ακόλουθες περιπτώσεις : α) Παραγωγή ξένων πρωτεϊνών με τις όξινες πρωτεΐνες του τυρογάλακτος (Whey Acidic Protein, WAP). Έχουν παραχθεί υγιή και γόνιμα διαγονιδιακά κουνέλια με τον υποκινητή των WAP συνδεδεμένο με το γονίδιο της αυξητικής ορμόνης hGH του ανθρώπου (Brem et al., 1993). Παρόμοιος συνδυασμός των WAP-hGH χρησιμοποιήθηκε σε πείραμα όπου προέκυψαν 5 διαγονιδιακά κουνέλια. Τα αυξημένα επίπεδα στον ορό του αίματος και η έκτοπη έκφραση δεν είχαν δυσμενείς επιδράσεις. β) Παραγωγή ξένων πρωτεϊνών με τις καζεΐνες. Το 1990 παρήχθη ένας γονιδιακός συνδυασμός με τον υποκινητή της β-καζεΐνης των κουνελιών και το ανθρώπινο γονίδιο της Ιντερλευκίνης II (Besenfelder et al., 1996). Δημιουργήθηκαν τρεις γονιδιακοί συνδυασμοί από το γονίδιο της προχυμοζίνης των βοοειδών και τμήματα του γονιδίου της as1-καζεΐνης. Το γάλα διαγονιδιακού κουνελιού που συλλέχθηκε σε 42 ημέρες γαλακτοπαραγωγής ήταν αρκετό για την πύξη 10.000 κιλών αγελαδινού γάλακτος (Brem et al., 1995). Το 1994 δημιουργήθηκαν δύο γονιδιακοί συνδυασμοί της as1-καζεΐνης των βοοειδών. Ο ένας περιελάμβανε μία συνθετική αλληλουχία DNA για την κωδικοποίηση του ανθρώπινου παράγοντα IGF-1 και ο άλλος μία αλληλουχία που κωδικοποιούσε ένα ανάλογο του IGF-1, το (Gln<sup>58</sup>)IGF-1. Η διαγονιδιακή έκφραση περιορίστηκε στο μαστικό αδένω χωρίς προβλήματα υγείας (Brem et al., 1994).

Σχετικά πρόσφατα δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά κουνέλια που εξέφραζαν την ανθρώπινη πρωτεΐνη C (human protein C, hPC) στο μαστικό τους αδένω. Η συγκέντρωση της ανασυνδυασμένης ανθρώπινης πρωτεΐνης C (rhPC) σε διαγονιδιακά κουνέλια κατά τη γαλακτοπαραγωγή μετά από προσδιορισμό με ELISA ήταν μεταξύ 0.24 και 0,56 μg/ml (Chrenek et al., 2002).

#### **Β) Έκφραση ξένων πρωτεϊνών στο κυκλοφορικό σύστημα διαγονιδιακών κουνελιών**

Η παραγωγή φαρμακευτικών πρωτεϊνών, όπως τα αντισώματα, αναμένεται να διεξάγεται ιδεωδώς στο αίμα των διαγονιδιακών ζώων, αφού το αίμα είναι ο φυσιολογικός τόπος παραγωγής τους. Σε μία πειραματική έρευνα, τα γονιδιακά αντίγραφα που κωδικοποιούν τις αλυσίδες μονοκλωνικών αντισωμάτων ποντικών εισήχθησαν στα γαμετικά κύτταρα ποντικών, κουνελιών και χοίρων. Σε δύο διαγονιδιακά κουνέλια ανιχνεύθηκαν αντισώματα στον ορό, στο γάλα και στον ορό των απογόνων τους.

Για να δημιουργηθεί ένα διαγονιδιακό ζώο, που στην παρουσία αντιγόνου θα παράγει μια ανθρώπινη ανοσοσφαιρίνη, πρέπει να απενεργοποιηθούν οι ενδογενείς ανοσοσφαιρίνες και να εισαχθούν σε αυτό τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ανθρώπινες ανοσοσφαιρίνες. Καθώς όμως τα ανθρώπινα αυτά γονιδιακά τμήματα είναι πολύ μεγάλα, θα πρέπει να δημιουργηθούν μικρότερα τμήματα ή τα μεγάλα αυτά τμήματα να κλωνοποιηθούν σε «τεχνητά» χρωματοσώματα ζυμών (Yeast Artificial

Chromosomes, YAC) (Besenfelder et al., 1996, Brem et al., 1996).

#### **Γ) Απόσπαση του αλβινικού φαινότυπου με τη χρήση τεχνητών χρωματοσωμάτων ζυμών**

Η δομή των τεχνητών χρωματοσωμάτων ζυμών (Yeast Artificial Chromosomes, YAC) ευνοεί το χειρισμό μεγάλων τμημάτων DNA. Στη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκε ένας γονιδιακός συνδυασμός, ο οποίος περιείχε το γονίδιο της τυροσινάσης του ποντικού “άγριου τύπου”. Η τυροσινάση είναι το ένζυμο “κλειδί” στο χρωματισμό. Το DNA του YAC, το οποίο έφερε το γονίδιο της τυροσινάσης, ενέθηκε σε γονιμοποιημένα ωοκύτταρα αλβινικών κουνελιών. Τα διαγονιδιακά κουνέλια αναγνωρίστηκαν από την παρουσία χρώματος στο δέρμα και στους οφθαλμούς (Brem et al., 1996).

#### **Δ) Διαγονιδιακά κουνέλια ως πρότυπα ασθενειών**

Το μέγεθος των κουνελιών καθιστά εύκολη τη διεξαγωγή αναλύσεων. Τα στοιχεία για τη φυσιολογία τους είναι πλέον γνωστά, ενώ η πληθώρα των ειδικών για τα κουνέλια αντιδραστηρίων και απαραίτητων για τη μελέτη ασθενειών είναι διαθέσιμη. Αυτά και η ποικιλία γενετικού ιστορικού θεωρούνται ευνοϊκά κατά τη μελέτη σύνθετων ασθενειών, γιατί αναπαρίσταται με μεγαλύτερη ακρίβεια η κατάσταση στους ανθρώπους. Τα κουνέλια χρησιμεύουν για τη μελέτη της ανισορροπίας στο μεταβολισμό του λίπους, της αρτηριοσκλήρωσης, καρκινογένεσης, μόλυνσης από τον ιό HIV-1, γονιδοθεραπείας και αυξημένης αντοχής στις ασθένειες (Besenfelder et al., 1996).

#### **Ε) Εκτροφή διαγονιδιακών κουνελιών**

Η διαγονιδιακή δράση στην ανάπτυξη των κουνελιών αποδείχθηκε με γονίδια που κωδικοποιούν την αυξητική ορμόνη (GH) είτε την απελευθερωτική (εκλυτική) ορμόνη της αυξητικής (GHRH). Αναφέρθηκαν αυξημένα επίπεδα ανάπτυξης, όμως σημειώθηκαν παθολογικές παρενέργειες, λόγω της πολυπλοκότητας της αλληλεπίδρασης εξωτερικών και ενδογενών παραγόντων στην ανάπτυξη. Επιπλέον, δεν πρέπει να λησμονηθεί η αντίδραση του καταναλωτικού κοινού στην παραγωγή διαγονιδιακών γιγαντιαίων ζώων. Στο μέλλον ίσως η γονιδιακή μεταφορά να στραφεί στη βελτίωση της ποιότητας της γούνας (Besenfelder et al., 1996).

#### **Μεταφορά γονιδίων στα κουνέλια: προοπτικές για την εμπορική της διάδοση**

Τα κριτήρια που καθορίζουν την εφαρμογή ή όχι διαγονιδιακών πειραμάτων είναι τα παρακάτω: 1) Επιλογή ιδιοτήτων που μπορούν να βελτιωθούν. 2) Ολοκλήρωση της υπάρχουσας επιστημονικής γνώσης για τις ιδιότητες αυτές και καθιέρωση ενός πρωτοκόλλου λειτουργικής μετατροπής του γονότυπου σε φαινότυπο. 3) Δυνατότητα επιλογής των γονιδίων και των αλληλουχιών που ενδεχομένως να επηρεάζουν τις συγκεκριμένες ιδιότητες. 4) Δο-



κιμές σε πρότυπα συστήματα, π.χ. κυτταροκαλλιέργειες θηλαστικών, πειραματόζωα. 5) Δυνατότητα εισαγωγής των γονιδίων και των αλληλουχιών στη γαμετική σειρά των κουνελιών.

Ο πιο συνήθης σκοπός της μεταφοράς γονιδίων είναι η παραγωγή οικονομικά σημαντικών πρωτεϊνών με μικρότερο κόστος και η εισαγωγή ενός αλληλομόρφου ή ανθεκτικών γονιδίων σ' έναν πληθυσμό. Τέλος, η μεταφορά γονιδίων παρέχει την δυνατότητα απάλειψης ή επιδιόρθωσης ανεπιθύμητων γονιδίων από έναν πληθυσμό και αποτελεί τη μόνη οδό για την ανταλλαγή γονιδίων μεταξύ διαφορετικών ειδών (Smidt and Niemann, 1989).

Ωστόσο, πρόκειται για βραδεία διαδικασία με υψηλό κόστος και πολλά ελαττωματικά διαγονιδιακά ζώα. Την

αύξηση των ποσοστών επιτυχίας εμποδίζει η φυσική επιλογή, η οποία επιτρέπει την επιβίωση και την αναπαραγωγή μόνο των πλήρως λειτουργικών ζώων (Illera et al., 1990, Besenfelder et al., 1993, 1996). Γενικά, η μεταφορά γονιδίων είναι πιο επιτυχής στα φυτά απ' ό,τι στα ζώα, ίσως επειδή πολλά φυτικά χαρακτηριστικά έχουν απλούς μηχανισμούς κληρονομικότητας (Bourdon, 1997). Γεγονός, όμως, είναι ότι με την πάροδο των ετών η έρευνα συνεχίζεται και αυξάνεται με την παραγωγή νέων προϊόντων βιοτεχνολογίας και τη συμμετοχή των κουνελιών όλο και περισσότερο ως «ζώντων βιοαντιδραστηρίων» (pharmaceutical farming) ως εναλλακτικά των κυτταροκαλλιεργειών και παραγωγής προϊόντων *in vitro* (Pivko et al., 2003). □

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

- Battaglini M, et al. (1982): Induzione della ovulazione e fecondazione strumentale nella coniglia. *Coniglicoltura*, 19 (12):45-51
- Bedford JM (1970): The influence of oestrogen and progesterone on sperm capacitation in the reproductive tract of the female rabbit. *J Endocr*, 46:191
- Besenfelder U. and Brem G. (1993): Laparoscopic embryo transfer in rabbits. *J. Reprod. Fertility* 99: 53-56.
- Besenfelder U., Aigner B., Muller M. and Brem G. (1996): Generation and Application of Transgenic Rabbits, 561-581.
- Besenfelder U., Brem U. and G. (1997): Endoscopic mediated transfer of tubal stage embryos and artificial insemination in rabbits. *Reproduction in domestic animals*, 32 (1-2): 90.
- Besenfelder U., Solti L., Seregi J. and Brem G. (1993): Influence of b-carotene on fertility in rabbits when using embryo transfer programs. *Theriogenology* 39 : 1093-1109.
- Besenfelder U., Solti L., Seregi J., Muller M. and Brem G. (1996): Different roles of b-carotene and vitamin A in the reproduction of rabbits. *Theriogenology* 45: 1583-1591.
- Besenfelder U., Strouhal C. and Brem G. (1998): A method for Endoscopic Embryo Collection and Transfer in the Rabbit. *J. Vet. Med. A*. 45: 1-000.
- Bourdon R (1997): Biotechnology and Animal breeding. In: *Understanding animal breeding*, pp. 405-417.
- Boussit D (1989) In: *Reproduction et insemination artificielle en cuniculture*. Editions AFC.
- Bozse Z., Hiripi L., Carnwath J.W., Nieman, H. (2003): The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic Research* 12: 541-553.
- Brachet ACR (1912): Behavior of cultured rabbit embryos. *Hebd Seances Acad Sci* 155 1191.
- Breitbart, F., Salmon, J., Orth, G. (1997): The rabbit viral skin papillomas and carcinomas: a model for the immunogenetics and HPV-associated carcinogenesis. *Clin. Dermatol.* 15 :237-247.
- Brem G., Besenfelder U., Aigner B., Muller M., Liebl I., Schutz G. and Montoliu L. (1996): YAC transgenesis in Farm Animals: Rescue of Albinism in rabbits. *Molecular reproduction and development* 44: 56-62.
- Brem G., Besenfelder U., Hartl P. (1993): Production of foreign proteins in the mammary glands of transgenic mammals. *International Journal of Chemistry and Biotechnology*.
- Brem G., Hartl P., Besenfelder U., Wolf E., Zinovieva N. and Pfaller R. (1994): Expression of synthetic cDNA sequences encoding human Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the mammary gland of transgenic rabbits. *Gene* 149: 351-355.
- Brem G., Hartl P., Besenfelder U., Zinovieva N., Seregi J., Solti L. and Hartl P. (1995): Mammary gland specific expression of chymosin constructs in transgenic rabbits. *Theriogenology* 43 : 175.
- Carney EW & Foote RH (1990): Effects of superovulation, embryo recovery, culture system and embryo transfer on development of rabbit embryos in vivo and in vitro. *J Reprod Fert*, 89:543-551.
- Chantry-Darmon C., Hayes H., Allain D., Pena B., Urien C., Bertaud M. Rochambeau H. De, Rogel-Gaillard C. (2004): Construction of an integrated genetic and cytogenetic map in the rabbit . 8th World Rabbit Congress, Mexico, 38-43.
- Chesné, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., Renard, J.P., (2002): Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nat. Biotechnol.* 20 :366-369.
- Chrenek P., Makarevich A., Vasicek D., Laurincik J., Bulla J., Gajarska T., Rafay J. (1998): Effects of superovulation, culture and microinjection on development of rabbit embryos in vitro. *Theriogenology* 50, 659-666.
- Chrenek P., Vasicek D., Makarevich A., Uhrin P., Petrovicova I., Lubon H., Binder BR, Bulla J (2002): Integration and expression of the WAP-h PC gene in three generation of transgenic rabbits. *Czech J. Anim. Sci* 47, 45-49.
- Chrenek P., Vasicek D., Makarevich A.V., Jurcik R., Suvogova K., Bauer, J. Rafay, J. Bulla, L. Hetenyi, J. Erickson , R. K. Paleyanda M. (2004): Stability of transgenic transmission in three generations of transgenic rabbits after single or double pronuclear microinjection. 8th World Rabbit Congress, Mexico, 44-50.
- Fan, J., Challah, M., Watanabe, T. (1999): Transgenic rabbit models for biomedical research: current status, basic methods and future perspectives. *Pathol. Int.* 49: 583-594.
- Fischer B (1987): Development retardation in cultured preimplantation rabbit embryos. *J Reprod Fert*, 79:115-123.
- Fox, R.R. (1993): Linkage map of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) (2n=44). In: *Genetics maps*, vol. 4. 6ème edition, 4, 258-263. Editor O'Brien S.J., Cold Spring Harbor Laboratory editions, New York.
- Hafez E (1993): Preservation and Cryopreservation of Gametes and Embryos. In: *Reproduction in farm animals*. 6th edition, 503-504.
- Hagen KW (1974): Colony husbandry. In : Weisbroth SH, Flatt RE, Kraus AL (eds). *The biology of the Laboratory Rabbit*. Academic Press. New York, San Francisco, London, :23-45

- Hammer, R.E., Pursel, V.G., Rexroad, C.E., Wall, R.J., Bolt, D.J., Ebert, K.M., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. (1985): Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 315: 680-683.
- Hayes, H., Rogel-Gaillard, C., Zijlstra, C., De Haan, N.A., Urien, C., Bourgeaux, N., Bertaud, M., Bosma, A.A. (2002): Establishment of an R-banded rabbit karyotype nomenclature by FISH localization of 23 chromosome-specific genes on both G- and R-banded chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* 98 :199-205.
- Illera MJ, Rodriguez de Sadia C, Munoz I & Illera M (1990): The effect of PMSG anti PMSG on the performance of rabbit embryos. *Theriogenology*, 33:253.
- Kauffman RD, Schmidt PM, Rall WF and Hoeg JM (1998): Superovulation of rabbit with FSH alter in vivo development of vetrified morulae. *Theriogenology*, 50:1081-1902.
- Korstanje, R., O'Brien, P.C.M., Yang, F., Rens, W., Bosma, A.A., Van Lith, H.A., Van Zutphen, L.F.M., Ferguson-Smith, M.A. (1999): Complete homology maps of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and human by reciprocal chromosome painting. *Cytogenet. Cell Genet.* 86 :317-322.
- Maurer RR, Hunt WL, Van Vleck LD & Foote RH (1968a): Developmental potential of superovulated rabbit ova. *J Reprod Fert*, 15:171-175.
- Maurer RR, Hunt WL & Foote RH (1968b): Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in dutch-belted rabbit. *J Reprod Fertil*, 15:93-102.
- McNitt I., Patton, Fahr L., Cheeke (1996): Rabbit reproduction. In: Rabbit production. 7th Edition, 260.
- Milan, D., Andersson, L., Looft, C., Amarger, V., Robic, A., Rogel-Gaillard, C., Iannuccelli, N., Caritez, J.C., Yerle, M., Gellin, J., Elsen, J.M., Chardon, P., Le Roy, P. (2000): Identification du gène RN à effet majeur sur la qualité de la viande chez le porc. *Journées Rech. Porcines en France.* 32 :357-360.
- Mortensen, A., Fisher Hansen, B., Fisher Hansen, J. (1994): The rabbit in atherosclerosis research. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*, 21:55-64.
- Mulsant, P., Rochambeau, H. DE (1996): Possible contribution of molecular genetics to the rabbit's future. 6th World Rabbit Congress, Toulouse, 9-12 Juliet, 2 :229-234.
- Onanoff J (1893): Rechercher sur la fecondation et la gestation des mammifères. *C. R. Soc Biol (Paris)* 45 719.
- Pivko Juraj et al. (2003): Regulation and evaluation of ovarian function and embryogenesis in normal and transgenic animals in vitro and in vivo. 5th frame programme of European Union. Publications of RIAP Nitra No. 8.
- Queney, G., Ferrand, N., Weiss, S., Mouge, L F., Monnerot, M. (2001): Stationary distribution of microsatellite loci between divergent population groups of European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Mol. Biol. Evol.* 18:2169-2178.
- Rogel-Gaillard, C., Piumi, F., Billault, A., Bourgeaux, N., Save, J.C., Urien, C., Salmon, J., Chardon, P. (2001): Construction of a rabbit bacterial artificial chromosome (BAC) library: application to the mapping of the major histocompatibility complex to position 12q1.1. *Mam. Genome* 12:253-255.
- Saratsi A., Tsiglianni Th., Besenfelder U., Anastasiadis A., Vainas E., and Brem G. (2002): Induction of multiple ovulation in rabbits using PMSG and hCG. *J. Hell. Vet. Med. Soc.*, v. 53, 3, 228-236.
- Schenk SL. (1880): Das Säugethierei Kunstlick befruchter au Beralb des Mutterthieres. *Mutt. Embr Int K K Univ Wien* 1 107.
- Schmidt PM, Hollifield VM, Lin X and Wildt DE (1992): Induced ovulation and adequate embryo recoveries in New Zealand. White rabbits treated with a low PMSG/HCG dose or single, daily injections of FSH-P. *Theriogenology*, 37:293.
- Smidt D. and Niemann H (1989): Embryo transfer techniques related to application fields. Clark A.J. *Germline manipulation of livestock*. In: Biotechnology for livestock production. Food & Agriculture Organization of the United Nation: 63-69, 79, 92, 93, 116, 117.
- Suzuki S, (1974): Cleavage of the fertilized ova. In: *An Atlas of mammalian ova*:95
- Theau-Clement M and Roustan A (1991): L' insemination artificielle chez la lapine. *El et Ins*, 245:3-12
- Wettemann RP and Hafs HD (1970): Sperm capacitation after injection of LH or HCG in rabbits. *Proc Soc Exp Biol Med*, 133:1002.
- Yang X, Jiang S, Kovacs A and Foote RH (1992): Nuclear totipotency of cultured rabbit morulae to support full-term development following nuclear transfer. *Biol Reprod*, 47:636-643.
- Ypsilantis P, Tsiglianni Th, Karagiannidis A (1996): The use of cytological examination of vaginal smears for the determination of domestic rabbit's estrus cycle. *Bull Hellenic Vet Med Soc*, 47(3):186-190.
- Zijlstra, C., De Haan, N.A., Korstanje, R., Rogel-Gaillard, C., Piumi, F., Van Lith, H.A., Van Zutphen, L.F.M., Bosma, A.A. (2002): Fourteen chromosomal localizations and an update of the cytogenetic map of the rabbit. *Cytogenet. Genome Res.* 97 :191-199.