

Olszańska, Bożena

Sprawozdanie z działalności Towarzystwa w 1996 r. : Sprawozdanie z działalności Wydziałów : Wydział IV Nauk Biologicznych : Referaty i streszczenia : Oogeneza u ptaków - mechanizmy molekularne i postęp metod badawczych

Rocznik Towarzystwa Naukowego Warszawskiego 59, 115-125

1996

Artykuł został zdigitalizowany i opracowany do udostępnienia w internecie przez Muzeum Historii Polski w ramach prac podejmowanych na rzecz zapewnienia otwartego, powszechnego i trwałego dostępu do polskiego dorobku naukowego i kulturalnego. Artykuł jest umieszczony w kolekcji cyfrowej bazhum.muzhp.pl, gromadzącej zawartość polskich czasopism humanistycznych i społecznych oraz w kolekcji mazowieckich czasopism regionalnych mazowsze.hist.pl.

Tekst jest udostępniony do wykorzystania w ramach dozwolonego użytku.

Wydział IV Nauk Biologicznych

Przewodnicząca: Teresa Pojmańska

Sekretarz: Lech Zwierzchowski

Wydział IV TNW liczył w końcu 1995 r. 47 członków, w tym 34 zwyczajnych i 13 korespondentów. W 1996 r. członek korespondent TNW, Józef F. Kubica uzyskał statut członka zwyczajnego. Przyjęto Adama Urbankę na członka zwyczajnego TNW oraz Stanisławę Tylewską-Wierzbanowską i Bożennę Olszańską na członków korespondentów.

W 1996 r. odbyło się 5 zebrań naukowych, na których wygłoszono następujące odczyty:

30 I – Krzysztof Wolfram, poseł UW: Zielone płuca Polski – element europejskiej strategii ochrony przyrody

26 III – Bożenna Olszańska: Molekularne mechanizmy oogenezy u ptaków

21 V – Adam Urbanek: Pantopizm w powstawaniu nowych gatunków organizmów pelagicznych

8 X – Andrzej Jerzmanowski: Frustracje biologa molekularnego

3 XII – Zbigniew Jaczewski: Niektóre problemy etyczne związane z cytowaniem publikacji naukowych.

W 1996 r. odbyły się także dwa zebrania organizacyjne (połączone z zebraniem naukowym); ich tematyka dotyczyła rozpatrzenia wniosków o przyjęcie zgłoszonych kandydatów na członków korespondentów i członków zwyczajnych TNW.

Referaty i streszczenia

Bożenna Olszańska

OOGENEZA U PTAKÓW – MECHANIZMY MOLEKULARNE I POSTĘP METOD BADAWCZYCH

Jaja i zarodki ptaka były ulubionym materiałem do badań morfologicznych i embriologicznych do czasu kiedy nastąpił intensywny rozwój metod biologii molekularnej. Wówczas zainteresowanie badaczy skierowało się ku organizmom o zapłodnieniu zewnętrznym, takim jak jeżowce, płazy, ryby, ze względu na obfitość materiału biologicznego oraz dostępność zarodków już od najwcześniejszych stadiów rozwojowych.

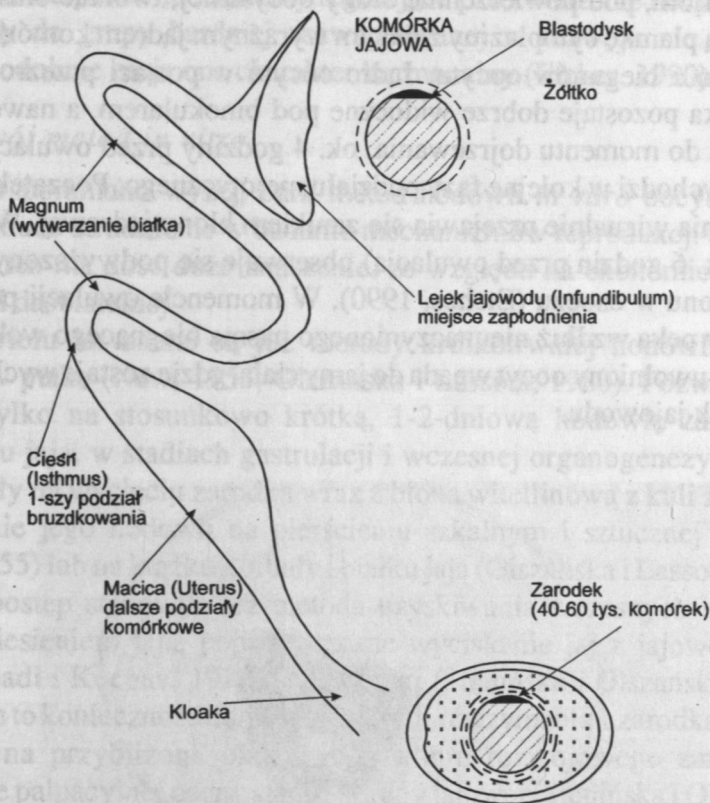
W latach 70., po opanowaniu metod hodowli zarodków i zapłodnienia *in vitro* oocytów ssaków, rozpoczął się również szybki postęp w badaniach mechanizmów rozwoju tej grupy zwierząt.

Na tym tle zadziwiający wydaje się brak tego rodzaju prac w dziedzinie biologii i rozwoju ptaków. W obszernej monografii E.H. Davidsona (1986) pt. „Gene Activity in Early Development” na ponad 2000 cytowanych pozycji bibliograficznych tylko kilka dotyczy ptaków; reszta to badania dotyczące jeźowców, płazów (*Xenopus*), *Drosophila* i ssaków (mysz). Jest to spowodowane głównie niedostępnością oocytów i zarodków ptaka we wczesnych stadiach rozwojowych, które przebiegają jeszcze w organizmie matki, brakiem metod hodowli *in vitro* oraz ceną pozyskania materiału biologicznego: dla otrzymania 1 oocytu w określonej fazie szybkiego wzrostu lub 1 zarodka w określonym wczesnym stadium rozwojowym należało ubić 1 samicę ptaka.

Układ rozrodczy samicy ptaka

Jajo w ód. Początkowy okres rozwoju zarodka ptaka przebiega w jajowodzie samicy. Oocyt zostaje zapłodniony w początkowej części jajowodu, tzw. lejku (*infundibulum*) w czasie ok. 15 minut po owulacji. Zapłodnione jajo (kula żółtkowa) przechodzi przez część jajowodu zwaną *magnum*, gdzie zostaje otoczone białkiem, w czasie 4-5 godzin po owulacji. Następnie, w zawężonej części jajowodu, cieśni (*isthmus*), całe jajo wraz z kapsułą białkową zostaje otoczone pierwszą osłoną jajową – przezroczystą, delikatną błoną i wówczas też zachodzą pierwsze 1 lub 2 podziały bruzdkowania. Potem jajo przesuwa się do końcowej części jajowodu, nieprawidłowo zwanej macicą (*uterus*), gdzie pozostaje aż do zniesienia jaja przez około 20 godzin. Cały cykl, regulowany przez warunki oświetlenia, powtarza się co 23-26 godzin. W macicy, początkowo przezroczysta osłona jajowa ulega zmętnieniu i wzmocnieniu i tworzy się zwapniała skorupa jajowa, u niektórych ptaków mająca charakterystyczne zabarwienie. Tutaj też zachodzą dalsze podziały komórkowe bruzdkowania, powstaje wyraźne zróżnicowanie osi przednio-tylnej zarodka i w momencie zniesienia jaja wielowarstwowy zarodek liczy już około 40 tysięcy (u przepiórki japońskiej) do 60 tysięcy komórek (u kury) (Eyal-Giladi i Kochav, 1976; Stępińska i Olszańska, 1983).

Po zniesieniu jaja, w obniżonej temperaturze, zarodek może pozostawać przez długi okres (u przepiórki nawet do 2-3 tygodni) w fazie zahamowania rozwoju i dopiero podwyższenie temperatury do 37-38°C powoduje podjęcie rozwoju przez zarodek aż do wylęgu; 21 dni dla kury, 18 dni dla przepiórki, w standardowych warunkach inkubacji.



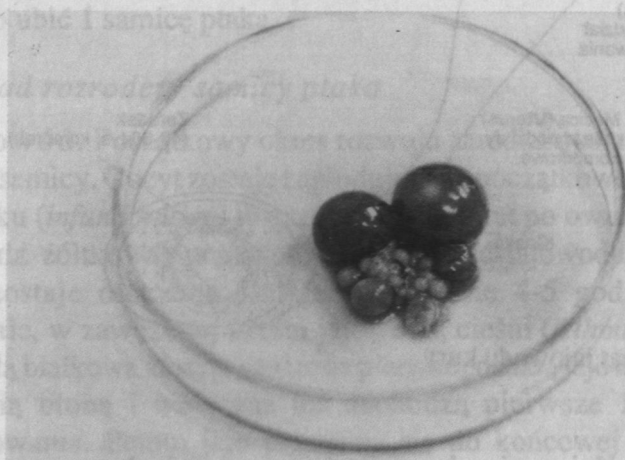
Rys. 1. Schemat jajowodu kury

Jajnik dojrzałej samicy kury zawiera oocyty będące we wszystkich stadiach rozwojowych, poczynając od najmniejszych oocytów prewitellogenicznych, poniżej 1 mm średnicy, poprzez rosnące oocyty 1-2 mm praktycznie nie zawierające jeszcze żółtka, aż do oocytów witellogenicznych, powyżej 3 mm średnicy, w których zaczyna się już gromadzić żółtko, dostarczane z zewnątrz – z wątroby. Kilka największych oocytów (u przepiórki japońskiej ok. 6 – 15 mm średnicy) tworzy hierarchiczny szereg oocytów, które weszły już w tzw. okres szybkiego wzrostu i będą owulować kolejno co 24-25 godzin.

Wszystkie oocyty od najmniejszych do największych, przed rozpoczęciem procesu dojrzewania, są jak gdyby „zawieszane” w stadium profazy I podziału mejotycznego.

Małe białe oocyty prewitellogeniczne (< 2 mm średnicy) posiadają stosunkowo duże jądra znajdujące się pośrodku oocyty. W oocytach większych (>2 mm średnicy) jądro wraz z grudką cytoplazmy przesuwają się

ku peryferiom, pod powierzchnię błony oocytarnej, tworząc blastodysk – małą białą plamkę cytoplazmy z dużym wyraźnym jądrem komórkowym – na jednym z biegunów oocytu. Jądro oocytu w postaci przezroczystego pęcherzyka pozostaje dobrze widoczne pod binokulem, a nawet gołym okiem, aż do momentu dojrzewania, ok. 4 godziny przed owulacją, kiedy to oocyt wchodzi w kolejne fazy podziału mejotycznego. Początek procesu dojrzewania wizualnie przejawia się zanikiem błony jądrowej. W tym też czasie (ok. 6 godzin przed owulacją) obserwuje się podwyższony poziom progesteronu w osoczu (Etches, 1990). W momencie owulacji pęcherzyk jajnikowy pęka wzdłuż nieunaczynionego pasma biegnącego wokół niego (stigma) i uwolniony oocyt wpada do jamy ciała, gdzie zostaje wychwycony przez lejek jajowodu.



Rys. 2. Jajnik przepiórki japońskiej

W jajniku oocyty znajdują się w pęcherzykach jajnikowych złożonych z warstw komórek folikularnych oraz *theca interna* i *theca externa*. Komórki folikularne otaczające oocyt tworzą liczne wypustki wpuklające się do błony oocytarnej, tak że powierzchnia ich kontaktu z oocytem ulega zwielokrotnieniu i przez błony te odbywa się transport odżywczych materiałów zapasowych tworzących żółtko, a także części macierzystego RNA (Schjeide i wsp., 1970).

Jajnik dojrzałej samicy kury zawiera bardzo dużo (>1000) małych białych oocytów prewitellogenicznych poniżej 1 mm średnicy, około 10-20 większych białych oocytów 3-5 mm średnicy, 5-7 małych żółtych oocytów witellogenicznych (5-10 mm średnicy) i kilka dużych żółtych oocytów witellogenicznych powyżej 10 mm średnicy, znajdujących się już w fazie

szybkiego wzrostu. Mechanizmy regulujące przechodzenie oocytów z jednej grupy do grupy bardziej zaawansowanej w rozwoju nie są znane, prawdopodobnie mają one charakter hormonalny (Etches, 1990).

Rozwój metod in vitro

Jak wspomniano wyżej, bark metod hodowli *in vitro* oocytów ptaka stanowił duże utrudnienie w badaniu mechanizmów reprodukcji u ptaków. Problem ten ma dość duże znaczenie, ze względu na ekonomiczną wagę produkcji drobiarskiej.

Od wielu lat znane są już metody krótkotrwałej hodowli *in vitro* zarodków ptaka (New, 1955; Olszańska i Lassota, 1980). Pozwalały one jednak tylko na stosunkowo krótką, 1-2-dniową hodowlę zarodka po zniesieniu jaja, w stadiach gastrulacji i wczesnej organogenezy. Metody te polegały na wycięciu zarodka wraz z błoną witelinową z kuli żółtkowej i następnie jego hodowli na pierścieniu szkalnym i sztucznej pożywce (New, 1955) lub na krążku z bibuły i białku jaja (Olszańska i Lassota, 1980). Pewien postęp stanowiła też metoda uzyskiwania wczesnych zarodków przed zniesieniem jaja, poprzez ręczne wyciskanie jaj z jajowodu kury (Eyal-Giladi i Kochav, 1976) i przepiórki (Stępińska i Olszańska, 1983). Eliminuje to konieczność ubijania samicy dla otrzymania 1 zarodka, a nawet pozwala na przybliżone określenie stadium rozwojowego zarodka na podstawie palpacyjnej oceny stanu skorupy jajowej (Stępińska i Olszańska, 1983).

Dopiero jednak w ostatnich latach została opracowana metoda pozwalająca na pełną hodowlę zarodka kurzego od stadium 1-komórkowej zygoty aż do wylęgu w warunkach *in vitro* (Perry, 1988). Po ubiciu samicy 1-komórkowy zarodek, wraz z kulą żółtkową i otaczającą ją kapsułą białkową, wyjmuje się ze środkowej części *magnum*, umieszcza w szklanym słoiczku na sztucznej pożywce na 1 dobę, a następnie przenosi do skorupy jajowej wypełnionej odpowiednią pożywką, inkubując we właściwej temperaturze. Metoda ta została w następnych latach nieco uproszczona i rozszerzona również na zarodki przepiórki japońskiej (Ono i wsp., 1994; Naito i Perry, 1989; Naito i wsp., 1990), tym niemniej pozostaje jednak metodą dość trudną, wymagającą dużej zręczności manualnej i odpowiedniego wyposażenia laboratorium.

Próby zapłodnienia *in vitro* oocytów ptaka wyjętych z jajowodu po naturalnej owulacji zakończyły się sukcesem (Olsen i Neher, 1948; Howarth, 1971; Nakanishi i wsp., 1990). Owulowane do jajowodu oocyty kury wyjmowano po ubiciu samicy, zapładniano *in vitro* plemnikami otrzymanymi od samców metodą masażu i albo umieszczano je na powrót

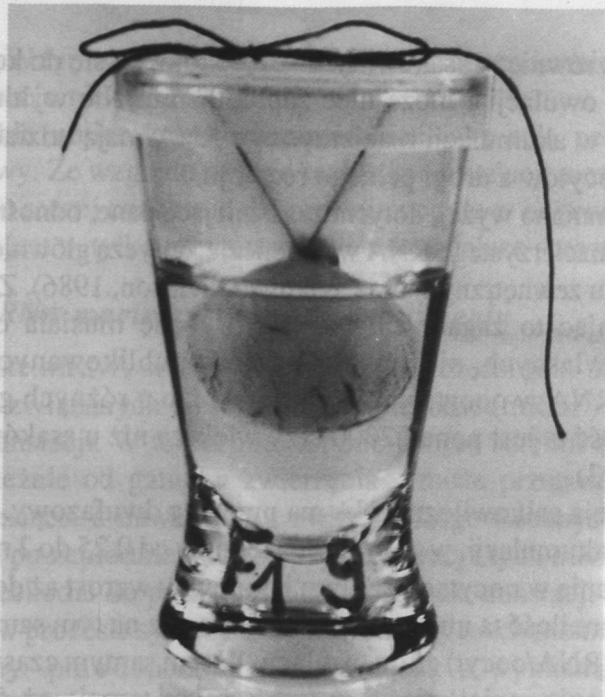
w jajowodzie samicy-biorczyni na drodze operacyjnej, co pozwalało na otrzymanie normalnych zapłodnionych jaj (Olsen i Neher, 1948; Howarth, 1971), lub też hodowano kilkanaście godzin w warunkach *in vitro*, otrzymując wielokomórkowy zarodek w stadium bruzdkowania (Nakanishi i wsp., 1990).

Dotychczas brakowało jednak metody hodowli oocytów pozwalającej na obserwację ich dojrzewania i owulacji w warunkach pozaustrojowych oraz na badanie wpływu określonych czynników fizjologicznych czy biochemicznych na te procesy. Pierwsze próby owulacji *in vitro* były podjęte przez badaczy amerykańskich (Nesher i wsp., 1950), którzy wycinali z jajnika kury pęcherzyki jajnikowe ok. 30 min. przed ich naturalną owulacją, umieszczali je w roztworze fizjologicznym w inkubatorze i w takich warunkach znaczna ich część (> 80%) owulowała w czasie 1 godziny. Jednak oocyty te już w momencie wycięcia z jajnika znajdowały się na granicy owulacji.

Ostatnio nasz zespół podjął próbę opracowania metody hodowli *in vitro* pęcherzyków jajnikowych przepiórki japońskiej, która pozwalałaby na dojrzewanie oocytu i jego owulację oraz badanie czynników mogących mieć wpływ na te procesy. Metoda taka została opracowana (Olszańska i wsp., 1996). Polega ona na hodowli pęcherzyków jajnikowych wycinanych z jajnika w określonym czasie przed owulacją i następnie inkubacji w temp. 41°C. W takich warunkach owulowało około 70% oocytów wyciętych z jajnika 2 godziny przed ich naturalną owulacją oraz 42% i 17% oocytów wyciętych z jajnika 4 i 6 godzin przed ich owulacją. Oocyty wycięte 24-26 godzin przed owulacją w tych warunkach nie owulowały.

Około 25% oocytów, które nie weszły jeszcze w stadium dojrzewania (wycięte 6 godzin przed owulacją) rozpoczynało spontanicznie proces dojrzewania w warunkach *in vitro*, a dodatek progesteronu do pożywki (0,3 i 1 µg/ml) istotnie stymulowało ten proces – dojrzewało około 70% oocytów (Olszańska i wsp., 1996). Zastosowanie takiej metody może pozwolić na stwierdzenie wpływu pewnych czynników na proces owulacji i dojrzewania oocytów ptasich – czynników takich, które byłyby trudne do zastosowania lub regulacji w warunkach *in vivo*.

Obecnie wydaje się też możliwe zapłodnienie *in vitro* oocytów owulowanych *in vitro*. Nasze próby zapłodnienia oocytów wyciętych z jajnika 2 i 4 godziny przed owulacją i owulowanych według opisanej metody doprowadziły do uzyskania wielokomórkowych blastoderm odpowiadających mniej więcej stadium IV/V rozwoju wewnątrzmacicznego zarodka (wg klasyfikacji Eyal-Giladi i Kochav, 1976, dane nieopublikowane).



Rys. 3. Pęcherzyk jajnikowy przepiórki w hodowli in vitro

Podsumowując, można się spodziewać, że obserwowany w ostatnich latach rozwój hodowli zarodka i oocytów ptaka pozwoli w przyszłości na rozwój badań w dziedzinie molekularnych mechanizmów reprodukcji u tej grupy zwierząt.

Macierzysty RNA

RNA macierzysty jest to RNA gromadzony w oocycie w trakcie oogenezy; po zapłodnieniu jest on wykorzystywany do syntezy białka przez zarodek. Należy pamiętać, że transkrypcja genomu zarodkowego nie rozpoczyna się bezpośrednio po zapłodnieniu, ale z pewnym opóźnieniem, w 2-, 4-, czy 16-komórkowych u ssaków, a nawet w okresie blastulacji – u *Xenopus*. Tak więc synteza białka w okresie wczesnego rozwoju zarodka jest uzależniona od RNA macierzystego, zsyntetyzowanego na genomie matczynym, aż do czasu rozpoczęcia syntezy własnego RNA zarodkowego, pochodzącego już ze wspólnej matrycy DNA matki i ojca (Davidson, 1986). Stąd wypływa wniosek, że wszelkie błędy (mutacje) w macierzystym RNA oraz zaburzenia w jego syntezie i gromadzeniu w oocytach będą miały odbicie w jakości oocytów, we wczesnej śmiertelności zarodków, czasami nawet tak wczesnej, że niezauważalnej w warunkach normalnej hodowli zwierząt. Ponadto, jak wiadomo, z ogromnej puli pęcherzyków jajnikowych

u ptaków, jak również i ssaków, tylko część rozwija się do końca, podlega dojrzewaniu, owulacji i może ulec zapłodnieniu. Nie wykluczone, że to błędy i braki w akumulacji macierzystego RNA mają udział w usuwaniu niektórych oocytów z drogi pełnego rozwoju.

Jak wspomniano wyżej, dotychczas istniejące dane, odnośnie do syntezy i akumulacji macierzystego RNA w oogenezie, dotyczą głównie organizmów o zapłodnieniu zewnętrznym oraz ssaków (Davidson, 1986). Z konieczności więc omawiając to zagadnienie u ptaków będę musiała oprzeć się na materiałach własnych, nie zawsze jeszcze opublikowanych. Ilości macierzystego RNA w oocytach różnią się bardzo u różnych grup zwierząt. U ptaków ilość ta jest ponad 2000 razy większa niż u ssaków (Olszańska i Borgul, 1993).

Akumulacja całkowitego RNA ma przebieg dwufazowy. Po początkowej szybkiej akumulacji, w oocytach o średnicy od 0,25 do 2 mm, następuje jej zahamowanie w oocytach 2-3 mm i ponowny wzrost aż do oocytów ok. 5 mm, po czym ilość ta utrzymuje się praktycznie na tym samym poziomie (ok. 4,5-5 μg RNA/oocyt) aż do owulacji. W tym samym czasie akumulacja mRNA następuje mniej więcej w tym samym tempie aż do oocytów o średnicy ok. 5 mm, po czym również osiąga plateau.

Należy jednak zwrócić uwagę na pewną sprzeczność otrzymanych wyników. Otóż ilość RNA w oocytach 4-5 mm wynosi ok. 4,5 μg /oocyt, gdy tymczasem ilość RNA w blastodyskach przepiórki wynosi jedynie ok. 1 μg /blastodysk (Olszańska i Borgul, 1993). Z tego wynika, że ponad 3/4 całkowitego RNA w blastodysku ulega degradacji w późniejszym okresie oogenezy, albo też ta pozostała brakująca część RNA znajduje się poza blastodyskiem. I rzeczywiście, dalsza analiza potwierdziła to drugie przypuszczenie o istnieniu dużej puli tzw. „pozazarodkowego” RNA znajdującego się pod błoną witelinową dookoła kuli żółtkowej. Istnienie tego „pozazarodkowego” RNA nie było dotychczas znane w literaturze. Po podsumowaniu ilości RNA pozazarodkowego (ok. 3,25 μg) i RNA znajdującego się w blastodysku (ok. 1,15 μg) otrzymujemy ok. 4,4 μg – ilość już bardzo zbliżoną (w granicach błędu) do ilości RNA znajdującej w oocytach o średnicy 5 mm (ok. 5,0 μg /oocyt).

Ten pozazarodkowy RNA w oocycie zawiera główne rodzaje RNA spotykane w komórkach, tj. rRNA, tRNA i RNA poliadenylowany, poli(A⁺)RNA, ten ostatni nawet w stężeniu większym (8,5%) niż w RNA zarodkowym w blastodysku (ok. 5,5%). Po owulacji, w trakcie przechodzenia jaja przez jajowód, RNA pozazarodkowy ulega rozkładowi i jego ilość zmniejsza się z ok. 3,25 μg /oocyt do 0,60 μg /jajo, a więc do 1/5 zawartości

początkowej. W tym samym czasie ilość RNA w blastodermie pozostaje na tym samym poziomie ok. 1,2 μg .

Obecnie nie umiemy jeszcze powiedzieć jaką rolę pełni ten RNA pozazarodkowy. Ze względu na jego rozkład po owulacji można przypuszczać, że ma on raczej znaczenie dla rozwoju oocyty w oogenezie, a nie dla zarodka – ale jest to tylko przypuszczenie wymagające sprawdzenia.

Rozkład RNA macierzystego po zapłodnieniu

Macierzyste mRNA w oocycie w znacznej części (ok. 80%) znajdują się w postaci związanych z białkami kompleksów (mRNP) nieczynnych w procesie translacji. W tej formie jest ono bardzo stabilne (Ebert i wsp., 1984) i – zależnie od gatunku zwierzęcia – może przetrwać w oocycie tygodnie, miesiące, a nawet lata u zwierząt długowiecznych. W okresie dojrzewania i po zapłodnieniu następuje aktywacja tych mRNA i znaczna ich część przechodzi do puli aktywnej w procesie translacji na polisomy, biorąc udział w procesie syntezy białka. Dokładny mechanizm tej aktywacji nie jest znany; prawdopodobnie ma związek z wymianą składników białkowych oraz ze skróceniem/wydłużeniem odcinka poli(A) znajdującego się na końcu 3' w mRNA (Bachvarova, 1992; Wickens, 1990).

Zaobserwowano, że u jeźowców i *Xenopus* ten odcinek poli(A) po zapłodnieniu ulega intensywnej degradacji i resyntezie (tzw. „turnover” – Darborough i Ford, 1979; Dolecki i wsp., 1977).

My z kolei stwierdziliśmy w oocytach przepiórki japońskiej obecność specyficznego enzymu rozkładającego odcinki poli(A) do oligonukleotydów o długości A_{10} (Olszańska i Stępińska, 1995). Enzym ten znajduje się głównie w jądrach, znacznie mniej w cytoplazmie i żółtku. Cechy tego enzymu (optimum pH, wymagania w stosunku do jonów Mn^{+2} , długość produktów rozkładu, lokalizacja w jądrze, specyficzność w stosunku do substratu poli(A), a nie poli(U), itp.) są podobne do cech rybonukleazy IV (E.C.3.1.26.6) wyizolowanej uprzednio przez Mullera (1976) z jajowodu kury i przepiórki.

Przy użyciu trytowanego ^3H -poli(U) jako substratu nie udało się wykryć w oocytach przepiórki obecności RNazy typu A – enzymu rozkładającego wszystkie rodzaje RNA, powszechnie występującego we wszystkich tkankach zwierzęcych i roślinnych (Olszańska i Stępińska, 1995). Ściślej mówiąc, obserwowana aktywność enzymatyczna była znikoma, odpowiadająca aktywności $< 10^{-5}$ jednostek Kunitza /oocyt, tj. praktycznie niewykrywalna (dane nieopublikowane).

Sądzę, że brak RNazy typu A w oocytach jest, poza innymi czynnikami (np. obecność białek ochronnych i specyficzne struktury na końcach 3'/5'), jedną z przyczyn tak znacznej stabilności macierzystego RNA w oocytach.

Podsumowanie

1. Opracowanie metod hodowli *in vitro* zarodka i oocytów ptaka może przyczynić się w najbliższej przyszłości do postępu badań nad biologią rozwoju i reprodukcją u ptaków.

2. Oocyty ptaka zawierają ogromną ilość macierzystego RNA (ok. 5 μ g/oocyt), którego większa część (3/4) znajduje się poza terenem zarodka, pod błoną żółtkową wokół oocytu.

3. Rola tego „pozazarodkowego” RNA nie jest jeszcze znana. Prawdopodobnie ma on raczej znaczenie w metabolizmie samego oocytu podczas oogenezy, a nie powstającego po zapłodnieniu zarodka, gdyż po owulacji znaczna część tego RNA ulega degradacji.

4. Oocyty przepiórki japońskiej wykazują znaczną aktywność enzymu rozkładającego poli(A), zlokalizowaną głównie w jądrze. Enzym ten prawdopodobnie bierze udział w rozkładzie odcinków poli(A) w poli(A+)RNA podczas dojrzewania i po zapłodnieniu oocytów.

5. W oocytach przepiórki japońskiej praktycznie nie obserwuje się obecności RNazy typu A, enzymu powszechnie występującego w świecie zwierzęcym i roślinnym. Brak tego enzymu może być jednym z czynników warunkujących wysoką stabilność macierzystego RNA w oocytach.

Literatura

Bachvarova R., (1992) A material tail of poly(A): The long and the short of it. *Cell*, 69, 895-897.

Darnborough C.H., Ford P.J., (1979) Turnover and processing of poly(A) in full-grown oocytes and during progesterone-induced oocyte maturation in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.*, 71, 323-340.

Davidson E.H., (1986) Gene activity in early development. 3rd Ed. Academic Press, Orlando - New York - London.

Dolecki G.J., Duncan R.F., Humphreys T., (1977) Complete turnover of poly(A) on maternal mRNA of sea urchin embryos. *Cell*, 11, 339-344.

Ebert K.M., Paynton B.V., McKnight G.S., Brinster R.L., (1984) Translation and stability of ovalbumin messenger RNA injected into growing oocytes and fertilized ova of mice. *J. Embr. Exp. Morph.*, 84, 91-103.

Etches R.J., (1990) The ovulatory cycle of the hen. *Critical Rev. in Poultry Biol.*, 2, 293-318.

Eyal-Giladi H., Kochav S., (1976) From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal tables and a new look at the first stages of the development of the chick. *Dev. Biol.*, 49, 321-337.

Naito M., Perry M.M., (1989) Development in culture of the chick embryo from cleavage to hatch. *Br. Poultry Sci.*, 30, 251-256.

Naito M., Nirasawa K., Oishi T., (1990) Development in culture of the chick embryo from fertilized ovum to hatching. *J. Exp. Zool.* 254, 322-326.

Nakanishi A., Utsumi K., Iritani A., (1990) Early nuclear events in *in vitro* fertilization in the domestic fowl. *Mol. Repr. Dev.*, 26, 217-221.

New D.A.T., (1955) A technique for the cultivation of the chick embryo *in vitro*. *J. Embr. Exp. Morph.*, 3, 338-341.

Neher B.H., Olsen M.W., Fraps R.M., (1950) Ovulation of the excised ovum of the hen. *Poultry Sci.*, 29, 554-557.

Olsen M.W., Neher B.H., (1948) The site of fertilization in the domestic fowl. *J. Exp. Zool.*, 109, 355-366.

Olszańska B., Lassota Z., (1980) Simple *in vitro* system for molecular studies of early avian development in the quail. *Br. Poultry Sci.*, 21, 295-303.

Olszańska B., Stepińska U., (1955) Comparison of poli(A)-degrading activity in the avian and mammalian oocytes. In: „Organization of the early Vertebrate embryo”, Zagris N., Duprat A.M., Durston A. (Eds), pp. 23-37. NATO ASI Series, Plenum Press, New York-London.

Olszańska B., Borgul A., (1993) Maternal RNA content in oocytes of several mammalian and avian species. *J. Exp. Zool.*, 265, 317-321.

Olszańska B., Malewska A., Stepińska U., (1996) Maturation and ovulation of Japanese quail oocytes under *in vitro* conditions. *British Poultry Sci.*, 37, 929-935.

Ono T., Murakami T., Mochii M., Agata K., Kino K., Otsuka K., Ohta M., Mizutani M., Yoshida M., Eguchi G., (1994) A complete system for avian transgenesis, supporting quail embryos from the single-cell stage to hatching. *Dev. Biol.*, 161, 126-130.

Perry M.M., (1988) A complete culture system for the chick embryo. *Nature*, 331, 70-72.

Schjeide O.A., Galey F., Grellert E.A., I-San Lin R., de Vellis J., Mead J.F., (1970) Macromolecules in oocyte maturation. *Biol. Repr.*, 2 (Suppl), 14-43.

Stepińska U., Olszańska B., (1983) Cell multiplication and blastoderm development in relation to egg envelope formation during uterine development of quail (*Coturnix coturnix japonica*) embryo. *J. Exp. Zool.*, 228, 505-510.

Wickens M., (1990) In the beginning is the end: regulation of poly(A) addition and removal during early development. *Trends in Bioch. Sci.*, 15, 320-324.