Turk J Vet Anim Sci
26 (2002) 1421-1426

Araştırma Makalesi

İn Vitro Üretilen Koyun Embriyolarının Transferi*

Sema BİRLER, Serhat PABUÇÇUOĞLU, Hatem ATALLA, Serhat ALKAN, Özen Banu ÖZDAŞ,
Süleyman BACINOĞLU, Ümüt CİRİT, İrem ZAVAR
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul – TÜRKİYE

Mehmet Emin Cumhur SÖNMEZ
Vetifarm Veteriner İlaçları Ticaret A.Ş., Harbiye, İstanbul – TÜRKİYE

İrfan Kamuran İLERİ
İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Avcılar, İstanbul – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 21.09.2001

Özet: Bu çalışmada in vitro üretilmiş koyun embriyolarının alıcı koyunlara transfer edilmesi hedeflenmiştir. Mezbahada kesilen Kıvırcık ırkı koyunların ovaryumları alınarak 30-35 ºC ısıdaki PBS (fosfat tamponlu tuz) solüsyonu içerisinde laboratuvara getirilmiştir. 1-6 mm çapındaki folliküllerin açılarak içlerinin yıkanmasıyla kumulus-oosit kompleksleri elde edilmiş ve sodyum piruvat, follikül stimülan hormon (FSH), luteinizan hormon (LH) ve %10 fötal buzağı serumu (FCS) ilaveli medyum-199 içerisinde, 38.5 ºC ısı ve %5 CO_2'li ortamda 24 saat olgunlaştırılmıştır. Üç adet Kıvırcık ırkı koçtan alınan ve pooling yapılan taze sperma, percoll-gradient yöntemi ile in vitro fertilizasyon amacıyla hazırlanmış ve %2 SES (östrustaki koyun serumu) ilaveli SOF bazlı fertilizasyon medyumu içine alınan oositlerin üzerine ilave edilerek (0.8×10^6 spermatozoon/ml) 20-21 saat inkübe edilmiştir. Fertilize edilen oositler sentetik ovidukt medyumuna (SOF) aktarılmış ve %5 CO_2, %5 O_2 ve %90 N_2'lu gaz karışımı bulunan ortamda 8 gün kültüre edilmiştir. Kültürdeki 4. gün oositlerin bulunduğu medyuma 1.5 mM glikoz ilave edilmiştir. Kültüre edilen embriyolar yarıklanma ve embriyo gelişimi açısından sırasıyla kültürün 4. ve 8. günü kontrol edilmiştir.

Çalışmada toplam 534 oosit in vitro fertilize edilmiş, bunlardan 407 tanesi (%76,2) yarıklanmıştır. Yarıklanan embriyolardan 119 (%29,2) morula ve 69 (%16,9) blastosist elde edilmiştir. Blastosist dönemindeki embriyolardan 40 tanesinin, östrus senkronizasyonu yapılmış 17 alıcı koyunun uterusuna transferinden 40 gün sonra yapılan ultrasonografik incelemelerde 10 tanesinin gebe olduğu (%58,8) saptanmıştır. Bunlardan 7 tanesi sağlıklı 8 kuzu doğurmuş, 7 kuzu taşıdığı saptanan diğer 3 koyunda ise değişik nedenlerden dolayı doğumlar gerçekleşememiştir. Transfer edilen embriyo sayısına göre, implantasyon oranı %37,5, sağlıklı doğan kuzu oranı ise %20,0 olarak gerçekleşmiştir.

Anahtar Sözcükler: Koyun, in vitro üretim, embriyo transferi

Transfer of In Vitro Produced Sheep Embryos

Abstract: The objective of the present study was to transfer sheep embryos produced in vitro to recipient ewes. Ovaries were taken from slaughtered Kıvırcık ewes and transferred to the laboratory in phosphate buffered saline (PBS) at 30-35 ºC. The cumulus-oocyte complexes were obtained by slicing and washing 1-6 mm diameter follicles and matured for 24 h in medium 199 supplemented with sodium pyruvate, follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and 10% fetal calf serum (FCS) at 38.5 ºC under 5% CO_2 in humidified atmosphere. Fresh semen was collected from three Kıvırcık rams, pooled and prepared for in vitro fertilization by the percoll-gradient method. Matured oocytes were transferred into synthetic oviduct fluid (SOF) based fertilization medium supplemented with 2% sheep oestrous serum (SES) and co-incubated with semen (0.8×10^6 spermatozoon/ml) for 20-21 h. After fertilization, presumptive zygotes were transferred into SOF medium and incubated for 8 days under an atmosphere of 5% CO_2, 5% O_2 and 90% N_2 at 38.5 ºC. Glucose (1.5 mM) was added to the culture medium on day 4. In culture, embryos were checked for cleavage and embryo development on days 4 and 8, respectively.

A total of 534 oocytes were inseminated in vitro, 407 (76.2%) cleaved, and 119 (29.2%) and 69 (16.9%) reached the morula and blastocyst stages, respectively. Forty days after the transfer of 40 blastocysts into the uteri of 17 recipient ewes, pregnancy was detected in 10 ewes (58.8%) by ultrasonography and 7 ewes gave birth to 8 live lambs. The other 3 ewes, which had 7 fetuses, could not have live offspring. According to the transferred embryos, the implantation rate was 37.5% and the live lamb rate was 20.0%.

Key Words: Sheep, in vitro production, embryo transfer

*Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir (Proje No: 1288/050599).

Giriş

Koyun populasyonu ile dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer alan Türkiye, kültür ırkı ve melezlerinin düşük oranda olması ve yerli ırk koyunların verim düzeylerinin düşüklüğü nedeni ile hayvansal üretim açısından istenilen düzeyde bulunmamaktadır. Günümüzde biyoteknolojik yöntemler kullanarak hayvan ıslahını hızlandırmak ve hayvanların verim düzeylerini artırmak mümkün görülmektedir. Bu uygulamalardan sun'i tohumlama ve embriyo transferi yanında in vitro fertilizasyon tekniği ile de istenilen özelliklerde daha fazla sayıda yavru elde edilebilmektedir. Özellikle in vitro fertilizasyon tekniği ile seksüel olgunluğa ulaşmamış genç hayvanlardan olduğu gibi, mezbahaya sevkedilmek zorunda kalınan değerli hayvanlardan da yararlanılabilmektedir. Ayrıca bu teknikler türü kaybolmak üzere olan hayvanların korunmasında da önemli bir yöntemdir (1-3).

Dünyada çiftlik hayvanları bazında in vitro fertilizasyon yöntemiyle üretilen embriyoların transferlerinden %18-65,7 oranlarında gebelik (2,4,5) ve %5-49 oranlarında yavru (2,5,6) elde edilmesine rağmen, ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalarda gebelik ve yavruya ulaşılamamıştır. Düşük gebelik ve yavru oranlarının sebepleri arasında in vitro olgunlaştırma, fertilizasyon ve kültür aşamalarında karşılaşılan yetersizlikler ve transfer edilen embriyo ile taşıyıcı koyun arasındaki senkronizasyon sorunları baş sıralarda yer almaktadır.

Bu çalışmada; mezbaha materyalinden elde edilen primer koyun oositlerinin in vitro olgunlaştırılması, in vitro fertilizasyonu ve fertilize edilen oositlerin 7-8 günlük in vitro kültürü ile geliştirilen blastosist dönemindeki embriyoların taşıyıcı annelere transferinden ülkemizde ilk kez gebelik ve yavru elde etmek amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

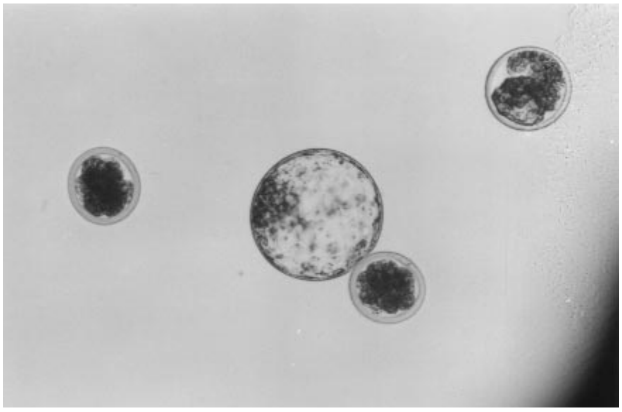
Çalışmanın materyalini İsmer mezbahasında (Tuzla, İstanbul) kesilen koyunların ovaryumları oluşturdu. Ovaryumlar 30-35 ºC ısıdaki PBS (fosfat tamponlu tuz) solüsyonu içerisinde laboratuvara getirildi. Medyumların hazırlanmasında kullanılan kimyasal malzemenin tümü "Sigma Chemical Company"den satın alınmıştır.

Oositlerin Elde Edilmesi ve Olgunlaştırılması: Ovaryum yüzeyinde bulunan 1-6 mm çapındaki folliküllerin açılması ve içlerinin Hepes tamponlu oosit yıkama medyumu [15 mM Hepes (free acid), 15 mM sodyum Hepes, 0.3 mg/ml sodyum bikarbonat, 0.01 mg/ml heparin sodyum tuzu, 0.075 mg/ml penisilin G-potasyum tuzu, 0.05 mg/ml streptomisin sülfat, 0.08 mg/ml kanamisin monosülfat ve %10 FCS ilaveli M-199 (with Earle's salts)] ile yıkanması sonucu elde edilen yıkantı sıvıları stereo mikroskop altında incelenerek kumulus-oosit kompleksleri (homojen vitellus ve en az 4 sıra kompakt kumulus hücrelerine sahip oositler) toplandı. Bu oositler 3 defa oosit yıkama medyumunda ve 1 defa in vitro olgunlaştırma medyumunda [0.3 mM Na piruvat, %10 FCS, 10 µg/ml FSH ve10 µg/ml LH ilaveli M-199 (with Earle's salts)] yıkanarak 4-gözlü petri kutularına transfer edildi. 4-gözlü petri kutularına yerleştirilen ve üzerleri mineral yağ ile kaplanan oositler 38.5 ºC ısı ve yüksek nemli ortamda %5 CO_2'li inkübatörde 24 saat inkübe edildi. Mezbahadaki kesim ile kültüre başlanma arasındaki sürenin 5 saati geçmemesine özen gösterildi.

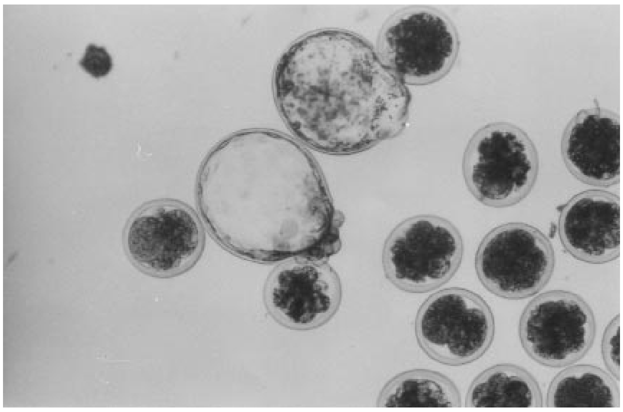
Oositlerin Fertilizasyonu: Fertilizasyon amacıyla elektro-ejakülatör yardımıyla elde edilen taze koç sperması kullanıldı. En az 3 koçtan alınan sperma pooling yapıldı ve percoll-gradient yöntemi ile hazırlandı. Kısaca; iki farklı Percoll tabakası (%90 ve %45) üzerine bırakılan sperma 1500 g'de 15 dakika santrifüje edildikten sonra üst kısım atılarak kalan pellet hepesle tamponlanmış SOF medyumuyla [3 mg/ml BSA-fraction V, 2.1 mg/ml sodyum bikarbonat, 0.72 mg/ml D-glikoz, 0.06 mg/ml pirüvik asit, 0.25 mg/ml L-glutamin, 0.12 mg/ml kanamisin monosülfat, 0.075 mg/ml penisilin G-potasyum tuzu, 0.05 mg/ml streptomisin sülfat ilaveli] sulandırıldı ve tekrar 600 g'de 6 dakika santrifüje edildi. Oluşan pellet sulandırılarak konsantrasyon tayini yapıldı ve bu şekilde hazırlanan spermatozoonlar (0.8×10^6 spermatozoon/ml) fertilizasyon medyumuna alınan [%2 SES ilaveli, bikarbonat tamponlu SOF (0.1 mg/ml pirüvik asit, 0.15 mg/ml L-glutamin, 0.08 mg/ml kanamisin monosülfat, 0.075 mg/ml penisilin G-potasyum tuzu, 0.05 mg/ml streptomisin sülfat ilaveli) medyumu] in vitro olgunlaştırılmış oositlerin üzerine ilave edildi.

Zigotların Kültürü: 20-21 saatlik fertilizasyonu takiben hücrelerin tümü 3 mg/ml BSA (fatty acid free), 20 µl/ml esansiyel aminoasit solüsyonu, 10 µl/ml nonesansiyel aminoasit solüsyonu, 0.03 mg/ml pirüvik asit, 0.04 mg/ml L-glutamin, 0.08 mg/ml kanamisin monosülfat, 0.075 mg/ml penisilin G-potasyum tuzu, 0.05 mg/ml streptomisin sülfat ilaveli kültür medyumuna (SOF medyumu) transfer edildi ve düşük oksijen düzeyinin sağlandığı (%5 CO_2+%5 O_2+%90 N_2) anaerobik jar içerisinde 39 °C ısı ve yüksek nem şartlarında 8 gün kültüre edildi. Kültürün 4. günü herbir kültür gözüne 1.5 mM glikoz ilave edildi. Kültürün 4. günü ve kültür sonunda değerlendirme yapılarak embriyoların yarıklanma (cleavage) ve gelişim durumları kaydedildi.

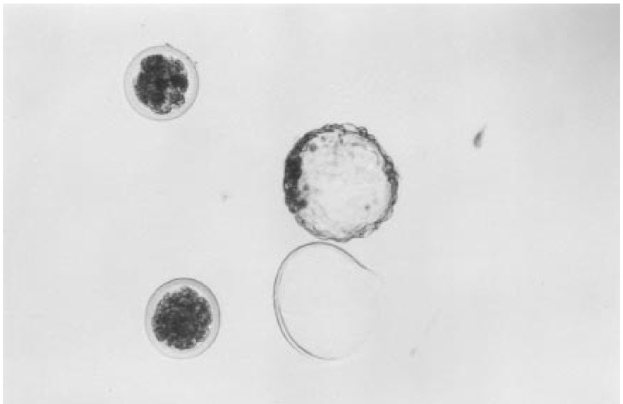
Embriyo Transferi: Kültür sonunda blastosist dönemine ulaşan embriyolar (Şekil 1-3) senkronize edilmiş alıcı koyunların (n=17) uteruslarına transfer edildi. Transfer işlemi koyunların aşım sezonu olan Temmuz-Ağustos aylarında gerçekleştirildi. Taşıyıcı koyunların hormonal açıdan embriyolarla aynı dönemde olması için bu koyunlarda östrus senkronizasyonu uygulandı. Senkronizasyon amacıyla 60 mg medroxyprogesterone acetate emdirilmiş vajinal süngerler (Synchron Sponge; Vetimex-Vetifarm) 14 gün boyunca tatbik edildi ve süngerlerin çıkarıldığı gün herbir koyuna 500 İ.Ü. PMSG hormonu (Synchroject; Vetimex-Vetifarm) kas içi enjekte edildi. Uygulamalardan 60 saat sonrası, östrus (0. gün) olarak kabul edildi. Taşıyıcı koyunlar transfer gününde sikluslarının 6. günlerinde olacak şekilde hazırlandı ve kültürde 7. günlerinde olan blastosist dönemindeki embriyoların transferleri gerçekleştirildi. Laparatomi amacıyla rompun ve diazem ile sedasyonu takiben koyunlara lumbo-sakral anestezi (Jetokain ampul) uygulandı ve sırt üstü yatırılan hayvanlarda median hattan memeye kadar uzanan ensizyon ile ovaryumlar bulundu. Alıcı hayvanlardaki ovaryum bulgularına göre, korpus luteum bulunan taraftaki kornu uterinin proksimal ucu küt bir kanülle delindi ve bu kısımdan girilerek yaklaşık 10 µl medyum içerisindeki embriyolar (2-3 adet) kornu içerisine transfer edildi (Şekil 4).



Şekil 1. Expanded (genişlemiş) blastosist döneminde bir koyun embriyosu.



Şekil 2. Hatching blastosist (zona pellusidadan çıkmakta olan) dönemindeki 2 embriyo.



Şekil 3. Hatched blastosist (zona pellusidadan çıkmış) dönemine ulaşmış bir koyun embriyosu.

Şekil 4. İn vitro üretilmiş embriyoların taşıyıcı koyunun uterusuna transfer edilmesi.

Gebelik tanısı: Embriyo transferi uygulanan alıcı hayvanlara operasyondan 40 gün sonra ultrasound (3.5MHz, mikrokonveks) ile gebelik incelemesi yapıldı. Gebeliğin teyit edilmesinde hem kotiledonların hem de yavrunun görülmesi esas alındı.

Bulgular

Çalışmada 534 oosit kullanıldı, bunlardan 407 tanesi (%76,2) yarıklanma (cleavage) gösterdi. Yarıklanan oositlerden 69 tanesi (%16,9) blastosist dönemine ulaştı. Elde edilen veriler Tablo 1'de yer almaktadır.

Blastosist dönemine ulaşım en erken kültürün 6. günü oldu. Elde edilen blastosistlerin %44,9'u (31/69) kültürün 6. günü, %46,4'ü (32/69) kültürün 7. günü ve %8,7'si (6/69) kültürün 8. günü bu aşamaya ulaştı. Embriyo transferi amacıyla sadece kültürün 6. ve 7. gününde blastosist dönemine gelişen embriyolar kullanıldı.

Embriyo transferi gerçekleştirilen 17 koyunun ovaryumlarında toplam 33 korpus luteum (en az 1, en fazla 3; koyun başına 1,9±0,7) tespit edilmiş olup, korpus luteumların bulunduğu taraftaki kornu uterilere 40 adet blastosist dönemindeki embriyo (en az 1, en fazla 3; koyun başına 2,4±0,7) transfer edildi. Transfer edilen 40 embriyonun 8 tanesi (%20,0) blastosist, 26 tanesi expanded (genişlemiş) blastosist (%65,0), 3 tanesi hatching (zona pellusidadan çıkmakta olan) blastosist (%7,5) ve 3 tanesi hatched (zona pellusidadan çıkmış) blastosist (%7,5) döneminde idi.

Transferleri gerçekleştirilen 17 koyunun gebeliklerinin 45. gününden (transfer günü = gebeliğin 6. günü) sonra yapılan ultrasonografik incelemelerinde 10 tanesinin gebe olduğu (%58,8) saptandı (Tablo 2). Bu koyunlarda 15 yavrunun varlığı belirlenmesine rağmen, sağlıklı doğum yapan 7 koyundan 8 sağlıklı kuzu (Şekil 5) elde edildi (gebelik süresi = 147±1,8 gün). Diğer 3 koyundan bir tanesi doğumuna 25 gün kala metabolik bir hastalık sonucu öldü ve yapılan otopside bu koyunun üçüz kuzu taşıdığı saptandı. Üçüz kuzu taşıyan diğer bir koyun ise vaginal akıntı nedeniyle sezaryene alındı ve kuzuların yaklaşık 2-3 aylık yaşta iken gelişimlerinin durduğu ve masere oldukları görüldü. Oldukça iri bir yavru taşıyan 3. koyunda ise doğum gerçekleşemediğinden yavru ölü bulundu.

Transfer edilen embriyo sayısına göre implantasyon oranı %37,5 (15/40), sağlıklı doğan kuzu oranı ise %20,0 (8/40) olarak gerçekleşti.

Tartışma

Mezbaha materyalinden elde edilen primer koyun oositlerinin in vitro olgunlaştırılması, fertilizasyonu ve blastosist dönemine kadar in vitro kültürünü takiben elde edilen blastosistlerin taşıyıcı koyunlara transferinin gerçekleştirildiği bu çalışmada, in vitro kültürdeki 6-8. günlerde blastosist dönemine ulaşıldığı gözlenmiştir. Bu gözlem, zigotların in vitro ortamda 4-6. günlerde, in vivo ortamda ise 5-6. günlerde blastosist dönemine ulaştığını bildiren Walker ve ark. (7)'nın verileri ile çelişkilidir. Buna karşın Gomez ve ark. (5), blastosist dönemine büyük

Tablo 1. İn vitro fertilizasyon ile elde edilen embriyoların gelişme durumları*.

Oosit Sayısı	Yarıklanan Oosit Sayısı (%)	Embriyo Sayısı	
		Morula (%)	Blastosist (%)
534	407 (76,2)	119 (29,2)	69 (16,9)

* Sekiz günlük in vitro kültür sonrası.

Tablo 2. İn vitro üretilen embriyoların transferini takiben ulaşılan sonuçlar.

Transfer edilen embriyo sayısı	Taşıyıcı koyun sayısı	Gebe kalan koyun sayısı (%)	Doğum yapan koyun sayısı (%)	Canlı yavru sayısı (%)*
40	17	10 (58,8)	7 (41,2)	8 (20,0)

* Transfer edilen embriyo sayısına göre hesaplanmıştır.

Şekil 5. İn vitro üretilmiş embriyoların transferi ile doğan ilk kuzular.

ölçüde 6 ve 7. günlerde ulaşıldığını bildirmiştir. Bu durum çalışmamızda da benzerdir.

Birçok araştırıcı (1,8-11) in vitro fertilizasyon ile oldukça düşük blastosist oranları (%0-7) bildirirlerken, O'Brien ve ark. (12), Sevillano ve ark. (3) ve Gomez ve ark. (5)'nın belirttikleri blastosist oranları (sırasıyla %6-11, %13 ve %18,8) sunulan çalışmada elde edilen blastosist oranına (%16,9) yakın gerçekleşmiştir. Buna karşın O'Brien ve ark. (2) ve Holm ve ark. (6,13)'nın bildirdikleri %30-40 blastosist oranları çalışmamızda elde ettiğimiz oranların oldukça üzerindedir.

Thompson ve ark. (14), in vivo olarak bir ve iki blastomerli döneme gelişmiş koyun embriyolarının in vitro kültürünü takiben transferi ile gebelik oranının %57 olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada in vitro fertilizasyon kullanıldığı halde gebelik oranı bu orana benzer olmuştur. Bu durum, oositlerin in vitro olgunlaştırılması ve fertilizasyonunun in vivo ortama yakın şekilde gerçekleştirilebildiğini göstermektedir.

O'Brien ve ark. (2), prepubertal koyun oositlerinin in vitro fertilizasyonu ile elde edilen embriyoların laparatomi ile transferini takiben %60 gebelik oranı, transfer edilen embriyolardan %35'inden ise yavru elde edildiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırıcılar (2) erişkin koyun oositlerinin in vitro fertilizasyonu ile elde edilen embriyoların laparatomi ile transferini takiben ise %65,7 gebelik oranı, transfer edilen embriyoların %40'ından ise yavru elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu oranlar çalışmamızda saptanan oranlardan (özellikle yavrulama oranı) yüksektir.

Aynı in vitro fertilizasyon protokolünü kullandığımız Gomez ve ark. (5), koyun başına ortalama 2,3 embriyonun transferinden 45. gün ultrason incelemelerine göre %41,1 gebelik oranı, %29,5 implantasyon oranı bildirmişlerdir. Her iki oran da sunulan çalışmadaki oranlara benzerdir.

Holm ve ark. (6), kültür ve transfer esnasındaki embriyo gelişim döneminin kuzulama oranları üzerine önemli etkisi olduğunu ifade etmişler ve morula, erken blastosist, expanded blastosist ve hatching blastosist transferlerinden sırasıyla %5, 7, 39 ve 49 oranlarında kuzulama elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda büyük oranda expanded blastosist transferi uygulanmış ve kuzulama oranı araştırıcıların bu grupta elde ettiği orana yakın olmuştur. İn vitro fertilizasyonla elde edilen koyun embriyolarını koyun ovidukt epitel hücreleri ile 5 gün ko-kültüre eden Czlonkowska ve ark. (4), saptadıkları yüksek morula oranını (%43) ko-kültüre bağlamışlardır. Fakat bu embriyoların transferi ile ulaşılan düşük gebelik oranını (%18) ise, embriyo-alıcı koyun arasındaki senkronizasyon yetersizliğine bağlamışlardır. Ancak bu durum aslında morula dönemindeki embriyoların transferine de bağlı olabilir.

İn vitro embriyo üretim çalışmaları, hayvan ıslahına yönelik olarak hem oosit ve spermatozoonlara hem de erken dönemdeki embriyolara dışarıdan müdahale edilmesine olanak sağlamakta olup bu çalışmaların sonrasında esas amaç sağlıklı yavrulara ulaşmaktır. Sunulan çalışmada elde edilen implantasyon, gebelik ve kuzulama oranları yapılan diğer çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında verilerimizin oldukça iyi düzeyde olduğu görülmektedir. Böylece in vitro üretilen (in vitro olgunlaştırma, fertilizasyon ve kültür sonucu elde edilen) embriyoların transferi ile Türkiye'de ilk kez sağlıklı yavrulara ulaşılmıştır.

Kaynaklar

1. Byrd, S.R., Flores-Foxworth, G., Applewhite, A.A., Westhusin, M.E.: In vitro maturation of ovine oocytes in a portable incubator. Theriogenology. 1997; 47: 857-864.
2. O'Brien, J.K., Catt, S.L., Ireland, K.A., Maxwell, W.M.C., Evans, G.: In vitro and in vivo developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. Theriogenology. 1997; 47: 1433-1443.

3. Sevillano, C., Anel, L., De La Fuente, J., Alvarez, M., Celorrio, I., De Paz, P., Boixo, J.C., Olmedo, J.A.: In vitro development of sheep embryos derived of repeated laparoscopic folliculoaspiration. Theriogenology, 1997; 47: 298 (Abstr.)

4. Czlonkowska, M., Eysymont, U., Guszkiewicz, A., Kossakowski, M., Dziak, J.: Birth of lambs after in vitro maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. Mol. Rep. Develop., 1991; 30: 34-38.

5. Gomez, M.C., Catt, J.W., Evans, G., Maxwell, W.M.C: Cleavage, development and competence of sheep embryos fertilized by intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. Theriogenology. 1998; 49: 1143-1154.

6. Holm, P., Walker, S.K., Petersen, B.A., Ashman, R.J., Seamark, R.F.: In vitro vs in vivo culture of ovine IVM-IVF ova: effect on lambing. Theriogenology. 1994; 41: 217 (Abstr.).

7. Walker, S.K., Heard, T.M., Seamark, R.F.: In vitro culture of sheep embryos without co-culture: Successes and perspectives. Theriogenology. 1992; 37: 111-126.

8. Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Alkan, S., Evecen, M., İleri, İ.K.: Effects of serum and hormone additives in maturation media and co-culture with sheep oviductal epithelial cells (SOEC) on in vitro fertilization of sheep oocytes. Society for the Study of Fertility, Annual Conference. 1999; 4-7 July, Aberystwyth, UK.

9. Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Alkan, S., Ak, K., Evecen, M., İleri, İ.K.: Effects of different maturation and culture media on in vitro fertilization of sheep oocytes. The Second International Alpha Congress. 1999; 16-19 September, Copenhagen, Denmark.

10. Madan, M.L., Naqvi, S.M.K., Chauhan, M.S., Singla, S.K., Manik, R.S.: In vitro production of ovine preimplantation embryos from in vitro matured oocytes using epididymal and frozen thawed spermatozoa. 12th Int. Cong. on Anim. Reprod. 1992; 3: 1318-1320.

11. Naqvi, S.M.K., Madan, M.L., Manik, R.S., Chauhan, M.S., Singla, S.K.: In vitro development of ovine oocytes matured and fertilized in vitro to compact morula in co-culture system of oviductal cells and conditioned medium. 12th Int. Cong. on Anim. Reprod. 1992; 3: 1327-1329.

12. O'Brien, J.K., Rhodes, S.L., Maxwell, W.M.C., Evans, G.: Hormonal requirements for in vitro maturation of sheep oocytes. Theriogenology. 1994; 41: 266 (Abstr.).

13. Holm, P., Walker, S.K., Seamark, R.F.: Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in vitro fertilized zygotes cultured in vitro or vivo. J. Reprod. Fert. 1996; 107: 175-181.

14. Thompson, J.G., Bell, A.C.S., McMillan, W.H., Peterson, A.J., Tervit, H.R.: Factors affecting in vitro development and post-transfer survival of cultured sheep embryos. Theriogenology. 1994; 41: 316 (Abstr.).