

Upotreba oocita i embriona začuvanje animalnih genetskih resursa *ex situ* (pregled)

Blagoje Stančić¹, Ivan Stančić¹, Stoja Jotanović², Refik Šahinović³,
Saša Dragin¹

¹Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, Srbija

²Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, Republika Srpska, BiH

³Poljoprivredni fakultet, Bihać, BiH

Sažetak

U posljednjih nekoliko dekada, genetski diverzitet domaćih životinja rapidno opada. S tim u vezi, postoji interes međunarodne zajednice za očuvanje genetike domaćih životinja. Model *in situ* čuvanja genoma je skup i značajno limitiran za praktičnu primenu. Zbog toga se razvija model *ex situ* (*ex vivo*) krioprezervacije animalnih genetskih resursa (banke gena) za regeneraciju pojedinih populacija u budućnosti. Iako postoji značajan napredak u krioprezervaciji oocita i embriona pojedinih vrsta domaćih životinja, do danas nije ustanovljena standardna procedura ove tehnologije. Uspješna dugotrajna krioprezervacija oocita i embriona će omogućiti očuvanje genetskog diverziteta i primenu brojnih tehnologija asistiranu reprodukciju domaćih životinja. Postoji biološki, ekonomski i moralni imperativ i interes međunarodne zajednice za očuvanje genetike domaćih životinja.

Ključne reči: oociti, embrioni, genetski resursi, čuvanje, *ex situ*.

Uvod

Skoro sve vrste domaćih životinja pokazuju značajno smanjenje genetskog diverziteta, što ima za rezultat trajni gubitak nekih genetskih osobina, važnih za očuvanje vrste, kao i za unapređenje njihove produktivnosti (Buerkle, 2007). Ovo je, pre svega, posledica: (a) primene intenzivne selekcije na vrlo mali broj produktivnih i reproduktivnih svojstava domaćih životinja u intenzivnom uzgoju, (b) primene savremenih biotehnologija, koje omogućavaju dobijanje velikog broja potomaka od jedne individue i (c) mogućnosti efikasnog transporta životinja, sperme, oocita i ranih embriona širom sveta (Patterson and Silversides, 2003).

S tim u vezi, nameće se sve veća potreba očuvanja biodiverziteta, formiranjem genetskih resursa ili tzv. banke gena postojećih vrsta i rasa domaćih životinja (Prentice i Anzar, 2011). Banke genetskih resursa se definišu kao sistematsko i organizovano prikupljanje, čuvanje i korištenje biološkoškog (genetskog) materijala. Čuvanje genetskog materijala se može izvoditi metodom *in situ* (*in vivo*) ili *ex situ* (*ex vivo*). Metodom *in situ* se genetski resursi čuvaju tako što se formiraju, odgajaju i razmnožavaju manji zapati živih životinja, pojedinih vrsta, rasa i linija (Bulla, 1996; Wildt, 1999; Stančić, 1999). Metodom *ex situ* se, najčešće, čuvaju gameti (muške i ženske polne ćelije, tj. spermatozoidi i oociti) (Johnston, and Lacy, 1995; Stančić i sar., 2005; Stančić i Dragin, 2011) ili rani embrioni, primenom tehnologije dubokog zamrzavanja (Stančić, 2004; Boettcher i sar., 2005; Pereira i Marques, 2008). Konzervacijom oocita se čuva samo genom ženke, dok se konzervacijom ranih embriona čuva kombinacija genoma i ženke i mužjaka, tj. majke i oca od kojih je embrion dobijen (Prentice i Anzar, 2011).

Zbog toga je cilj ovog rada da se prikažu savremene reproduktivne biotehnologije za dobijanje i dugotrajno čuvanje oocita i ranih (preimplantacionih) embriona domaćih životinja *ex situ*.

Pregled literature

Program dugotrajnog čuvanja genetskih resursa domaćih životinja ima za cilj efikasno produžavanje genetskog života pojedinih individua unutar jedne vrste, rase ili linije, kako bi se njeni geni mogli koristiti u selekcijskim programima i posle njene biološke smrti. Konzervacija genetskih resursa *ex situ* se izvodi tehnologijom dubokog zamrzavanja (krioprezervacija) gameta (Johnston, and Lacy, 1995; Stančić, 2000; Stančić i sar., 2001; Stančić i sar., 2002; Stanković, 2012), embriona ili somatskih ćelija tkiva testisa ili jajnika (Andrabi and Maxwell, 2007; Pereira i Marques, 2008).

Dobijanje oocita

Postoje dva osnovna načina za dobijanje (prikupljanje) oocita (jajnih ćelija) od ženki domaćih životinja: (a) indukcijom superovulacije, primenom egzogenih gonadotropina (eCG i hCG) i (b) ekstrakcijom oocita iz antralnih ovarijalnih folikula (Stančić i sar., 1992; Laurinčik i sar., 1992; Stančić i sar., 2007).

Metodom superovulacije se dobija dosta ograničen broj oocita. Osim toga, vrednost superovulacije znatno varira individualno, zavisno od rase i vrste životinja, njihove opšte telesne kondicije, starosti i zdravstvenog stanja, kao i od vrste, doze i kombinacije primenjenih hormonskih supstanci. Pored toga, primena hormonskih supstanci može izazvati i razne poremećaje funkcije jajnika, sve do sterilnosti. Kod krava se može dobiti prosečno 8,7 ovulacija po jednom tretmanu, sa variranjem od 2 do 50 ovulacija. Kod ovce vrednost superovulacije varira od 1,9 do 14,4, a kod svinje se vrednost izazvane superovulacije kreće između 25 i 46 (Stančić i sar., 1992; Šahinović, 1995; Stančić i sar. 1998; Stančić i Veselinović, 2002).

Za dobijanje znatno većeg broja oocita, koji se koriste za *in vitro* manipulaciju i dobijanje većeg broja embriona, koristi se metoda njihove ekstrakcije iz ovarijalnih folikula (tzv. folikularni oociti). Ova metoda se naročito koristi kod svinja, jer se metodom superovulacije ne dobija značajno veći broj jajnih ćelija, od onog koji se dobija spontanom ovulacijom (10 do 15 oocita kod nazimica i 15 do 23 kod krmača). Tako se, kod krave, može dobiti 8 do 14 oocita po jajniku (Wiebke, 1993). Metodom aspiracije antralnih folikula, posle žrtvovanja polno zrelih nazimica, dobijeno je prosečno 7,9 oocita, a metodom totalne resekcije jajnika 45,3 oocita po jajniku (Stančić i sar. 1993). Prednost dobijanja folikularnih oocita se sastoji u tome što se mogu koristiti jajnici velikog broja žrtvovanih životinja. Osim toga, ne koriste se skupe hormonske supstance i izbegava se njihovo štetno dejstvo na životinju. Primena visokih doza hormonskih supstanci, radi izazivanja superovulacije, posebno PMSG, često dovodi do dobijanja većeg broja degenerisanih oocita i do pojave većeg broja neovuliranih i/ili cističnih folikula na jajnicima tretiranih životinja (Moor i sar. 1985; Stančić i sar. 1991).

Nedostatak ove metode se, međutim, sastoji u tome što folikularni oociti nisu sposobni za oplodnju, neposredno posle ekstrakcije iz folikula. Naime, ogromna većina folikularnih oocita (preko 95%), koji se nalaze u jajniku, imaju jedro inhibirano u stadijumu diplotena prve mejotičke deobe (Crozet, 1991). Zbog toga je potrebno izvršiti *in vitro* dozrevanje folikularnih oocita do stadijuma metafaze druge mejotičke deobe (tzv. MfII-oociti). Takvi oociti su sposobni za oplodnju (McDonald, 1989). Ako se odstrane kumulusne ćelije sa površine oocita, dobijenog ekstrakcijom iz folikula, a oociti stave na kultivaciju *in vitro*, tokom 24 do 48h, preko 80% oocita dozreva do MfII, tj. postaju sposobni za oplodnju (Fukui, 1989). Dodavanje hormona, kao što su p-FSH (Laurinčik i sar. 1993), FSH i LH (Šahinović i sar. 1994), folikularne tečnosti (Nagai, 1994), epidermalnog faktora rasta ili nekih drugih bioaktivnih supstanci (Singh i sar. 1993), povećava uspeh *in vitro* kultivacije (dozrevanja) folikularnih oocita, mereno brojem (%) oocita koji su, tokom kultivacije, dostigli stadijum MfII neuklearnog dozrevanja. Kvalitet kumulus-oocitarnog kompleksa je direktno povezan sa sposobnošću oocita da dovrše dozrevanje (do MfII), tokom *in vitro* kultivacije. Oociti sa kompaktnim i ekspanovanim kumulusom imaju jedro u stadijumu GV ili GVBD, dok su oociti sa parcijalnim ili bez kumulusa, najčešće, degenerisani (Laurinčik i sar. 1992).

Dobijanje embriona

Za dugotrajno čuvanje, metodom dubokog zamrzavanja u tečnom azotu, koriste se vrlo rani embrioni (do stadijuma morule ili ranog blastocista) (Paynter i sar., 1999). Ovakvi embrioni se mogu dobiti na dva osnovna načina: (a) ispiranjem iz jajovoda ili uterusu superovuliranog i osemenjenog donora ili (b) *in vitro* fertilizacijom oocita, dobijenih ispiranjem jajovoda donora ili oocita dobijenih ekstrakcijom iz ovarijalnih folikula. Ispiranje embriona od donora se može izvršiti na tri načina: (1) hirurški, (2) nehirurški (transcervikalno) ili (3) endoskopskim pristupom na reproduktivne organe (Besenfelder i sar. 1998). Prikupljanje embriona se vrši kada su stari 5 do 8 dana, odnosno kada se nalaze u stadijumu morule ili blastocista. Hirurška i metoda endoskopije (laparoskopije) se može primeniti kod svih životinja, a nehirurška metoda se

primenjuje kod velikih životinja (krava, kobila). U svakom slučaju, embrioni se ispiraju iz kaudalnog istmusa (završni kraj jajovoda) ili iz vrhova rogova materice, primenom specijalnih katetera i specifične tečnosti (medijuma) za ispiranje (Stančić i Veselinović, 2002).

In vitro fertilizacija (IVF) oocita, dobijenih iz folikula i dozrevanih in vitro (IVM), ili oocita dobijenih posle superovulacije, je vrlo dobar metod dobijanja ranih embriona, jer jajnik predstavlja značajan izvor oocita (Courot i Vallard-Nail, 1991). Primarni uslovi za uspeh in vitro fertilizacije su: kvalitetni zreli (MfII) oociti, kapacitirani spermatozoidi, adekvatni medijumi za IVF, kao i optimalni uslovi mikroklimata (temperatura, sastav i odnos gasova) kultivacije. Ipak, glavni faktor uspešne IVF su dobro kapacitirani spermatozoidi (Thibault i sar. 1988). Uspeh IVF se meri brojem (%) normalno, tj. monospermično penetriranih oocita, kao i brojem oplodjenih oocita, koji su se razvili do stadijuma 2 ili 4 blastomere. Kod goveda se dobija preko 72% monospermično i 4,2% polispermično oplodjenih oocita in vitro (Šahinović, 1995). Međutim, kod svinja IVF rezultira vrlo visokim procentom polispermično penetriranih oocita (Šahinović i sar., 1997). Tako je Šahinović (1995) dobio čak 84% polispermičnih, od ukupnog broja penetriranih oocita. Precizan uzrok ove pojave nije potpuno jasan, ali rezultati novijih istraživanja ukazuju na metode prekulivacije i kapacitacije spermatozoida, kao i njihove koinkubacije sa oocitima, koje smanjuju stepen polispermije kod IVF svinja (Besenfelder i sar. 1998). Broj kapacitiranih spermatozoida u koinkubaciji sa oocitima, takođe utiče na uspeh IVF. Obično je ovaj broj između 1 i 6 miliona po mililitru medijuma (Cshum i sar. 1990). Na uspeh IVF utiče i vrsta upotrebljenog medijuma, supstance koje se dodaju osnovnom medijumu za IVF, kao i trajanje perioda koinkubacije oocita i spermatozoida (Šahinović, 1995). Većina autora smatra da koinkubacija treba da traje 6 časova, jer se tada dobija najveći broj monospermično penetriranih oocita. Za in vitro razvoj embriona, karakteristična je pojava tzv. bloka embrionalnog razvoja. Naime, in vitro oplodjeni oociti svinje se, u in vitro uslovima, razvijaju do stadijuma 4 blastomere, a goveda do stadijuma 16 blastomera i tada se dalji razvoj blokira. Kod embriona miša se ova blokada događa već u stadijumu 2 blastomere. Neka istraživanja pokazuju da ovaj blok izazivaju glukoza i fosfati, koji se dodaju u medijume za IVF (Edwards, 1989).

Krioprezervacija oocita i embriona

Krioprezervacija podrazumeva izlaganje oocita ili embriona vrlo niskim temperaturama, obično temperaturi tečnog azota (-196°C). Na tako niskoj temperaturi, biološke aktivnosti ćelija se trenutno stopiraju, pa se funkcionalni status ćelije zadržava tokom dugog perioda. Zamrzavanje mora biti brzo, kako bi se sprečilo formiranje ledenih kristala u ćelijama, što dovodi do njihove smrti (Wolfe and Bryant, 2001). I drugi faktori, kao što su promena osmolariteta, toksično delovanje krioprotektantnih supstanci u medijumu, povišena intracelularna koncentracije elektrolita i drugi stresogeni, dovode do velikih oštećenja i/ili smrti ćelija (Vajta, 2000). Ovaj problem se prevazilazi smanjenjem volumena kontejnera i dodavanjem krioprotektantnih materija

u medijume za zamrzavanje. Pokazalo se da antifriz-proteini, šećeri ili antioksidanti stabilizuju ćelijsku membranu tokom zamrzavanja (Ledda, 2001).

Tokom krioprezervacije, značajan broj oocita ili embriona biva oštećen i, posle odmrzavanja, nije sposoban za dalji razvoj. Step en ovih oštećenja zavisi od oblika i veličine ćelije, kvaliteta oocita ili embriona, permeabilnosti ćelijske membrane, a ovi faktori variraju u zavisnosti od vrste životinje (Vajta and Kuwayama, 2006). Dosadašnja istraživanja pokazuju da krioprezervaciju bolje podnose rani embrioni nego oociti. Tačan razlog nije ustanovljen, ali jedan od razloga može biti razlika u građi i osmotskom potencijalu plazmalne membrane oocita i embriona (Chen i sar., 2003).

Diskusija

Prema izveštajima FAO, kod svih vrst domaćih životinja se uočava sve veći pad biodiverziteta, kao posledica primene uske selekcije na poželjne produktivne osobine i primene savremenih reproduktivnih biotehnologija za intenzivno razmnožavanje malog broja jedinki. Zbog toga, postoji sve veći zahtev za istraživanjem efikasnih biotehnoških metoda dugotrajne konzervacije genoma postojećih vrsta, rasa i linija domaćih životinja (Prentice i Anzar, 2011).

Konzervacija genetskih resursa se vrši metodom *in situ*, formiranjem malih zapata pojedinih vrsta životinja, ili *ex situ*, dugotrajnom krioprezervacijom sperme, oocita, embriona ili somatskih ćelija testisa i ovariuma (Wildt, 1999). Na taj način je moguće izvršiti razmnožavanje poželjnih genotipova, kada se za to ukaže potreba, iako su životinje donatori ovih reproduktivnih ćelija ili tkiva već odavno mrtvi. Iako je tehnologija krioprezervacije dosta napredovala, naročito poslednjih decenija, uspeh preživljavanja duboko zamrznutih oocita i embriona, još uvek, nije zadovoljavajući. Praktična iskustva pokazuju da uslove dubokog zamrzavanja i otapanja, znatno bolje podnose rani embrioni u poređenju sa oocitima (Chen i sar., 2003). Osim toga, tehnologija krioprezervacije je dosta složena i skupa, pa nije dostupna za široku primenu. Zbog toga je potrebno kombinovati upotrebu metode *in situ* i *ex situ*, sa ciljem što uspešnijeg očuvanja biodiverziteta domaćih životinja.

Očuvanje genetskog biodiverziteta domaćih životinja je globalni imperativ u biološkom, ekonomskom i moralnom pogledu. Biološki, zbog toga što je biodiverzitet ključni uslov opstanka života na našoj planeti. Ekonomski, zbog toga što čovek koristi ogroman broj životinjskih vrsta za proizvodnju hrane, lekova, hemijskih supstanci, tehnoloških materijala, energije i slično. Moralni, zbog toga što je čovek, kao dominantna vrsta, odgovoran za održavanje i zaštitu svih ostalih vrsta živih organizama, sa kojima mora živeti na ovoj planeti (Stančić, 1999).

Zaključak

Na osnovu iznetih činjenica u vezi sa mogućnostima i potrebom očuvanja genetskog biodiverziteta domaćih životinja, moguće je zaključiti sledeće:

1. Poslednjih decenija se zapaža sve veći pad biodiverziteta svih vrsta domaćih životinja.

2. Ovo je posledica intenzivne selekcije na mali broj produktivnih osobina, kao i primene efikasnih reproduktivnih biotehnologija, sa ciljem da se dobije što veći broj potomaka od jedne jedinke.
3. Čuvanje genetskih resursa je moguće izvesti metodom *in situ* i *ex situ*.
4. Krioprezervacija oocita i embriona je moćna metoda dugotrajnog čuvanja genoma postojećih vrsta domaćih životinja.
5. Očuvanje genetskog biodiverziteta je biološka, ekonomska i moralna obaveza čoveka, kao dominantne vrste na ovoj planeti, koja značajno utiče na opstanak svih ostalih živih organizama.

Literatura

1. *Andrabi, S.M.H. and Maxwell, W.M.C.*: A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, 99(3-4)223–243, 2007.
2. *Besebfelder, U., Muler, M., Brem, G.*: Transgenics and Modern Reproductive Technologies. In: *The Genetic of the Pig* (eds. M.F. Rothschild and A. Ruvinsky). CAB Int., pp. 345-374, 1998.
3. *Boettcher, P.J., Stella, A., Pizzi, F., Gandini, G.*: The combined use of embryos and semen for cryogenic conservation of mammalian livestock genetic resources. *Genetics Selection Evolution*, 37(6)657–675, 2005.
4. *Buerkle, T.*: FAO sounds alarm on loss of livestock breeds. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007, <http://www.fao.org/>.
5. *Cashun, S., Sambuichs, A., Lim, Y.C., Rikihisa, Y.*: Fertilizability and subsequenced developmental ability of bovine oocytes matured in media containing epidermal growth factor (EGF). *Theriogenology*, 36:485-494, 1990.
6. *Chen, S.U., Lien, Y.R., Chao, K.H., Ho, H.N., Yang, Y.S. Lee, T.Y.*: Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing—a review article. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 202(1-2)101–107, 2003.
7. *Courot, M. and Vallard-Nail, P.*: Management of Reproduction in Farm Animals: Present and future. INRA, Nouzilly, France, pp. 23-37, 1991.
8. *Crozet, N.*: Manipulation of oocytes and in vitro fertilization. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 43:235-243, 1991.
9. *Edwards, G.R.*: Improving the growth of mammalian embryos in vitro. *Research in Reprod.*, 21(2)3-8, 1989.
10. *Fukui, Y.*: Effects of sera and steroidal hormones on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro and co-cultured with bovine oviductal epithelium cells. *J. Anim. Sci.*, 67:1318-1323, 1989.
11. *Johnston, A.L. and Lacy, C.R.*: Genome Resource Banking for Species Conservations: Selection of Sperm Donors. *Cryobiology*, 32:68-77, 1995.

12. Laurinčik, J., Pivko, J., Stančić, B., Šahinović, R., Grafenau, P.: Metode dobijanja oocita i osobine oocit-kumulus kompleksa u goveda, korištenih za kultivaciju in vitro. *Biotehnologija u stočarstvu*, 8(3-4)3-7, 1992.
13. Laurinčik, J., Rath, D., Niemann, H.: Differences in pronucleus formation and first cleavage following in vitro fertilization between pig oocytes matured in vitro and in vivo. *J. Reprod. Fert.*, 102:277-284, 1994.
14. Ledda, S., Leoni, G., Bogliolo, L., Naitana, S.: Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. *Theriogenology*, 55(6)1359-1371, 2001.
15. McDonald, E.L.: *Veterinary Endocrinology and Reproduction* (forth ed.). Lea & Febiger, Philadelphia, London, 1989.
16. Moor, M.R., Osborn, C. J., Crosby, J.J.: Gonadotrophins induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fert.*, 74:167-171, 1985.
17. Nagai, H.: Current status and perspectives in IVM - IVF of porcine oocytes. *Theriogenology*, 41:73-78, 1994.
18. Painter, S., Cooper, A., Thomas, N., Fuller, B.: Cryopreservation of Multicellular Embryos and Reproductive Tissues. In: *Reproductive Tissue Banking* (A.M. Karow and J.K. Crister, ed.). Academic Press, San Diego, London, pp. 399-440, 1999.
19. Patterson, D.L. and Silversides, F.G.: *Farm Animal Genetic Resource Conservation. Why and how?*, 2003. [http://www.cfagr.com/Farm Animal Genetic Resource Conservation Why and How.htm](http://www.cfagr.com/Farm%20Animal%20Genetic%20Resource%20Conservation%20Why%20and%20How.htm).
20. Pereira, R.M., Marques, C.C.: Animal oocyte and embryo cryopreservation. *In: Cell and Tissue Banking*, 9(4)267-277, 2008.
21. Singh, B., Barbe, G.J., Armstrong, D.T.: Factors influencing resumption of meiotic maturation and cummulus expansion of porcine oocyte-cummulus cells complex in vitro. *Molecular Reprod. Develop.*, 36:113-119, 1993.
22. Stančić, B. i Veslenivoć, S.: *Biotehnologija u reprodukciji domaćih životinja* (monografija). Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 2002.
23. Stančić, B., Laurinčik, J., Šahinović, R., Kubovičova, Elena, Oberfranc, M.: Dobijanje, broj i neke morfološke osobine folikularnih oocita svinja. *Biotehnologija u stočarstvu*, 1-2: 23-31, 1992.
24. Stančić, B., Marijanović, M., Šahinović, R.: Folikularni oociti svinje, kao izvor ranih embriona (pregled). *Savremena poljop.*, 4(1-2)195-198, 1993.
25. Stančić, B., Pivko, J., Grafenau, P., Laurinčik, J., Oberfranc, M., Šahinović, R.: Ovulaciona vrednost i razvojni stadijumi ranih embriona nazimica tretiranih sa PMSG ili p-FSH. I. Medjunarodni simpozijum "Stočarstvo na pragu 21. veka". *Biotehnologija u stočarstvu*, 8(5-6)85-90, 1992.
26. Stančić, B., Pivko, J., Grafenau, P., Oberfranc, M., Kubovičova, Elena: Rezultati naših istraživanja u oblasti biotehnologije reprodukcije svinja (pregled). 1. Kongres veterinarara Republike Srpske (sa medjunarodnim učesćem), Banja Luka, 28-30. oktobar, 2001. *Zbornik radova*, str. 93, 2001.
27. Stančić, B., Radović, I., Stančić, I., Gagrcin, M.: Sinhronizacija estrusa i fertilitet nazimica tretiranih različitim hormonskim preparatima. *Savremena poljoprivreda*, 56(3-4)8-13, 2007.

28. *Stančić, B., Šahinović, R.* (1991):The ovulation rate and early embryonic development in sows after treatment with PMSG+HCG. 42nd Ann. Meeting EAAP, Berlin, sept. 8-12, 1991., pp. 458-459.
29. *Stančić, B.*:Our results of biotechnological methods application in control of swine reproductive function. Proc. Int. Conf. on Sustainable Agriculture and European Integration Processes. Novi Sad, 19-24. Sept., 2004., pp.38.
30. *Stančić, B.*: Primena nekih biotehnologija reprodukcije svinja u formiranju genetskih resursa. Savremena poljoprivreda, 48(1-2)29-37, 1999.
31. *Stančić, B.*:Savremeni principi tehnologije veštačkog osemenjavanja svinja (pregledni referat po pozivu). 3. Simpozijum "Uzgoj i zaštita zdravlja svinja". Vršac, 21-23. jun, 2000. Zbornik radova, str. 35-41, 2000.
32. *Stančić, I., Dragin, S.*: Modern technology of artificial insemination in domestic animals. Contemporary Agriculture, 60(1-2)204-214, 2011.
33. *Stančić, L.B., Pivko, J., Grafenau, P., sen.*: Our results of biotechnological methods application in control of swine reproductive function. Savremena poljoprivreda, 54(1-2)47-50, 2005.
34. *Stančić, L.B.*:Biotechnology in swine reproduction: A review of our investigations. Buletinul Univ. Sci. Agric. Med. Vet., Cluj (Romania), 57:232-234, 2002.
35. *Stanković, B.*: Procena uspeha dubokog zamrzavanja na osnovu kvaliteta spermatozoida u nativnoj spermi nerasta i fertilitet intrauterino osemenjenih krmača (doktorska disertacija). Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet, 2012.
36. *Šahinović, R.*:Osobine, dozrevanje i oplodnja folikularnih oocita svinja i goveda. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu. Poljop. fakultet, 1995.
37. *Šahinović, R., Laurinčik, J., Stančić, B., Pivko, J.*:Nuclear maturation of pig oocytes after in vitro cultivation by different medium. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, 87:17-22, 1994.
38. *Šahinović, R., Stančić, B., Božić, A., Pivko, J., Grafenau, P., Oberfranc, M., Trivunović, S.*: Manipolacija sa folikularnim oocitima svinja i goveda. 3. In vitro oplodnja folikularnih oocita. Letopis naučnih radova, Poljop. Fak., N. Sad, 21(2)68-75, 1997.
39. *Šahinović, R., Stančić, B., Pivko, J., Grafenau, P., Oberfranc, M., Trivunović, S.*: Manipulacija sa folikularnim oocitima svinja i goveda. 1. Dobijanje i kvalitet oocita. Letopis naučnih radova, Polj. fak., Novi Sda, 21(1)52-60, 1997.
40. *Šahinović, R., Stančić, B., Pivko, J., Grafenau, P., Oberfranc, M., Trivunović, S., Božić, A.*: Manipulacija sa folikularnim oocitima svinja i goveda. 2. In vitro kultivacija folikularnih oocita. Letopis naučnih radova Poljop. fak., N. Sad, 21(2)62-67, 1997.
41. *Thibault, C., Crozet, N.*:La fecondation in vitro des ovocytes de brebis et de vache pent-elle entre dans la pratique de l'élevage? 3rd Word Congr. on Sheep and Beef Cattle Breeding, 19-23 Juin, 1988., Paris, vol. 1:79-91.

42. *Vajta, G. and Kuwayama, M.*: Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65(1)236–244, 2006.
43. *Vajta, G.*: Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 60-61:357–364, 2000.
44. *Wiebke, N.*: Ex vivo collection of bovine cummulus oocyte complex by transvaginal follicular aspiration guided by laparoscopy. Thesis. Univ. of Munich, p109, 1993.
45. *Wildt, E.D.*: Genome Resource Banking. In: *Reproductive Tissue Banking* (A.M. Karow and J.K. Crister, ed.). Academic Press, San Diego, London, pp. 399-440, 1999.
46. *Wolfe, J. and Bryant, G.*: Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. *International Journal of Refrigeration*, 24(5)438–450, 2001.

Using Oocytes and Embryos in *Ex-situ* Conservation of Animal Genetic Resources (a Review)

Blagoje Stančić¹, Ivan Stančić¹, Stoja Jotanović², Refik Šahinović³,
Saša Dragin¹

¹*Faculty of Agriculture, Novi Sad, Serbia*

²*Faculty of Agriculture, University of Banja Luka, Republic of Srpska, BiH*

³*Faculty of Agriculture, Bihać, BiH*

Abstract

In the last few decades, farm animal genetic diversity has been rapidly declining. Therefore, it is in the interest of the international community to conserve livestock genetics. The *in situ* (live animal herds) model of genome conservation is expensive and limited for practical use. As a result, *ex situ* (*ex vivo*) conservation models are developed to cryopreserve animal genetic resources in a genome (gene banks) to regenerate a particular population in the future. Although significant progress has been made in oocyte and embryo cryopreservation of several domestic species, to date, a standardised procedure has not been established. Successful long-term cryopreservation of oocytes and embryos would enable preservation of the genetic material of animals facing extinction and facilitate many assisted reproductive technologies. There is a biological, economical and moral imperative and interest of the international community to conserve the livestock genetics.

Key words: oocytes, embryos, genetic resources, preservation, *ex situ*.

Blagoje Stančić

E-mail Address:

blagoje.stancic@stocarstvo.edu.rs