

Univerzitet u Beogradu
Fakultet veterinarske medicine

ZBORNİK PREDAVANJA ČETVRTOG REGIONALNOG SIMPOZIJUMA
PROCEEDINGS OF THE FOURTH REGIONAL SYMPOSIUM

ZAŠTITA AGROBIODIVERZITETA I OČUVANJE
AUTOHTONIH RASA DOMAĆIH ŽIVOTINJA
PROTECTION OF AGROBIODIVERSITY AND PRESERVATION OF
AUTOCHTHONOUS BREEDS OF DOMESTIC ANIMALS

Dimitrovgrad, 29. jun – 1. jul, 2023.

Četvrti regionalni simpozijum:
**ZAŠTITA AGROBIODIVERZITETA I OČUVANJE AUTOHTONIH
RASA DOMAĆIH ŽIVOTINJA**
Dimitrovgrad, 29.06. – 1.07. 2023.

Organizator:

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Suorganizatori:

Akademija veterinarske medicine Srpskog veterinarskog društva

Centar za očuvanje autohtonih rasa, Beograd

Veterinarska komora Srbije

Organizacioni odbor:

Milorad Mirilović (predsednik), Suzana Đorđević Milošević, Darko Đorđević,
Vladimir Džabirski, Sergej Ivanov, Dobrila Jakić Dimić, Ljiljana Janković, Mišo
Kolarević, Sava Lazić, Dragan Mančev, Cvijan Mekić, Jelena Nikitović, Predrag
Perišić, Miloš Petrović, Ivan Pihler, Čedomir Radović, Zoran Rašić, Slobodan Simić,
Zoran Stanimirović, Dragiša Trailović, Milivoje Urošević, Miroslav Urošević,
Radka Vlaeva

Programski odbor:

Milan Maletić (predsednik), Pančo Dameski, Toni Dovenski, Vladan Đermanović,
Stefan Đoković, Milutin Đorđević, Zoran Kulišić, Kalin Hristov, Radomir Mandić, Ivan
Pavlović, Nikica Prvanović Babić, Marko Ristanić, Srđan Stojanović, Ružica Trailović,
Slobodanka Vakanjac, Miloš Vučićević, Ervin Zečević

Sekretarijat:

Tamara Petrović (sekretar), Darko Davitkov, Lazar Marković, Elmin Tarić, Branislav
Vejnović, Darko Drobñjak, Maja Gabrić

Izdavač:

Fakultet vetrinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Za izdavača:

Prof. dr Milorad Mirilović, dekan

Urednik:

Prof. dr Milan Maletić

Redaktor teksta:

Prof. dr Dragiša Trailović

Štampa:

Naučna KMD, Beograd, 2023.

Tiraž:

300 primeraka

**MOGUĆNOST KRIOPREZERVACIJE REPRODUKTIVNOG*
MATERIJALA AUTOHTONIH VRSTA DOMAĆIH ŽIVOTINJA
U OČUVANJU ANIMALNIH GENETIČKIH RESURSA**
*THE POSSIBLE USE OF CRYOPRESERVATION OF REPRODUCTIVE
MATERIAL OF AUTOCHTHONOUS ANIMALS AIMED FOR
CONSERVATION OF ANIMAL GENETIC RESOURCES*

Slobodanka Vakanjac, Svetlana Nedić, Vladimir Magaš, Jovan Blagojević,
Milan Maletić

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Kratak sadržaj

Veliki ekonomski razvoj, rast i mobilnost stanovništva, povećali su potražnju za mlečnim i mesnim proizvodima, ali su takođe izvršili pritisak na održivost ruralnih sredina i menadžment proizvodnje hrane. Uzgajivači stoke bi trebalo da povećaju svoju efikasnost da bi ispunili uslove povećane potražnje ovih proizvoda uz prilagođavanje životinjskih genetičkih resursa promenljivim ekonomskim i ekološkim uslovima. Prema podacima FAO (2007a), značajan deo od oko 7.000 rasa stoke u svetu je u opasnosti od izumiranja, a veliki problem predstavlja i što mnoge zemlje i dalje nemaju tehnički i materijalni kapacitet da obezbede pravilno upravljanje i održivost njihovih genetičkih resursa. Očuvanje životinjskih genetičkih resursa je treća strateška prioritetna oblast u svetu u okviru globalnog akcionog plana. Čuvanje genetičkih resursa uključuje i održavanje in vivo i upravljanje genetičkom raznolikoću unutar populacija životinja. Razvoj banke gena koja omogućava kriokonzervaciju gena poreklom od životinja zahteva tehničke i naučne kapacitete u genetici, reproduktivnoj fiziologiji, kriobiologiji i bioinformatici. Strategije očuvanja genetičkih resursa mogu se kategorisati kao in situ konzervacija (u kojoj se životinje održavaju u okruženju ili u proizvodnim sistemima u kojima su razvijeni) ili kao ex situ konzervacija (svi ostali slučajevi). Drugo mogu se dalje podeliti na ex situ – in vivo i in vitro konzervaciju i kriokonzervaciju. Kriokonzervacija in vitro podrazumeva čuvanje uzoraka duboko zamrznutog semena, jajnih ćelija, embriona ili tkiva za potencijalnu buduću upotrebu u uzgoju.

Ključne reči: autohtone rase, kriokonzerviranje, seme, embrioni, jajne ćelije

*Predavanje po pozivu

Summary

Strong economic development, population growth and mobility have increased demand for dairy and meat products, but also put pressure on rural sustainability and food production management. Livestock producers should increase their efficiency to meet the increased demand for these products while adapting animal genetic resources to changing economic and environmental conditions. According to FAO (2007a), a significant proportion of the world's approximately 7,000 livestock breeds are threatened with extinction, and a major problem is that many countries still lack the technical and material capacity to ensure proper management and sustainability of their genetic resources. Globally, the conservation of animal genetic resources is the third strategic priority area under the Global Plan of Action. Conservation of genetic resources encompasses both in vivo conservation and the management of genetic diversity within animal populations. The development of a gene bank that enables the cryopreservation of animal genes requires technical and scientific capacities in genetics, reproductive physiology, cryobiology and bioinformatics. Genetic resource conservation strategies can be categorised as in situ conservation (where animals are kept in the environment or production systems in which they were developed) or ex situ conservation (all other cases). The latter can be further subdivided into ex situ, in vivo and in vitro conservation and cryopreservation. In vitro cryopreservation involves the preservation of frozen semen, oocyte, embryo or tissue samples for possible future use in breeding.

Key words: *autochthonous breeds, cryopreservation, embryos, oocytes, semen*

UVOD

Tržište zahteva uzgoj malog broja rasa koje su selektivno razvijene u pravcu specijalizovane proizvodnje. Smanjen je ekonomski interes za uzgoj onih rasa, pa čak i vrsta domaćih životinja koje ne zadovoljavaju zahteve intenzivne proizvodnje. Kao posledica, dolazi do nestanka tih životinjskih vrsta i rušenja ruralnih zajednica. Autohtone životinjske vrste ili rase predstavljaju jedinstveno genetičko nasleđe, nastale su na određenom geografskom području i prilagođene su uslovima života tog područja. Ove životinjske vrste se najčešće uzgajaju tradicionalno, u slobodnom držanju i njihova ishrana se sastoji od postojećih biljnih resursa. Autohtone rase odlikuje otpornost prema bolestima tako da se ne zahtevaju veća ulaganja u njihovu zdravstvenu zaštitu, a na ovaj način se dobijaju proizvodi posebnog i dobrog kvaliteta. Kriterijumi za utvrđivanje ugroženosti rase propisani su Pravilnikom o listi genetskih rezervi domaćih životinja, načinu očuvanja genetskih resursa domaćih životinja, kao i listi autohtonih rasa domaćih životinja i ugroženih autohtonih rasa (Službeni glasnik RS, broj 33/17). Tradicionalne rase domaćih životinja su stare (autohtone) izvorne rase, koje su zapostavljene jer imaju slabije proizvodne rezultate u odnosu na druge produktivnije rase. Međutim, one čuvaju stari izvorni gene-

tski kod, prilagodljivije su na nepovoljne uslove držanja i otpornije su na bolesti. U Evropi ima preko 600 rasa domaćih životinja koje se nalaze na listi ugroženih vrsta i rasa, i to toliko ugroženih da je 43% njih već u fazi nestanka, odnosno u fazi konačnog, totalnog istrebljenja. Razvojem genetskih istraživanja omogućilo bi se da ne dođe do drastičnog i nepovratnog gubitka biološkog genofonda. Zbog toga je većina zemalja preduzela aktivnosti na očuvanju animalnih genetičkih resursa (FAO, 2012; Animal genetic resources strategy for Europe, 2022) Za očuvanje genetskih rezervi domaćih životinja mogu se koristiti sledeće metode:

- 1) *In situ* – podrazumeva aktivan dinamičan pristup zaštite rasa, odnosno gajenje životinja u tradicionalnim proizvodnim sistemima gde su nastale ili se sada nalaze i uzgajaju;
- 2) *Ex situ* – podrazumeva aktivan pristup zaštite rasa izvan proizvodnih sistema gde su nastale i može biti: *in vivo* – podrazumeva održavanje populacije životinja koje se ne drže pod normalnim uslovima upravljanja (npr: zoo-vrtovi ili istraživački centri) i *in vitro* – podrazumeva očuvanje u kriogenim uslovima uključujući, između ostalog, kriokonzervaciju semena, jajnih ćelija, embriona, somatskih ćelija, DNK i drugog biološkog materijala koji može biti iskorišćen za rekonstituisanje životinja (Uchoa i sar., 2012).

UZORCI KOJI SE MOGU ČUVATI U BANKAMA GENA

Seme

Glavna prednost upotrebe semena za kriokonzervaciju je to što postojeće tehnologije omogućavaju da se veoma lako uzima, razređuje i zamrzava seme većine domaćih životinja. Formirani su centri za veštačko osemnjenjavanje goveda, malih preživara, konja i svinja, čija je namena da se u njima drže životinje od kojih se uzima ejakulat kome se procenjuje kvalitet, a zatim se razređuje i zamrzava. Postojanje ovih centara omogućava lakšu nabavku, skladištenje i upotrebu dugo zamrznutog semena, ali može se i koristiti za skladištenje semena autohtonih rasa domaćih životinja i njegovo neograničeno čuvanje u tečnom azotu.

Ne podnose svi ejakulati domaćih životinja dobro krioprezervaciju, tako na primer, seme pastuva ima visok stepen individualne varijacije u procentu uspešnosti preživljavanja spermatozoida nakon odmrzavanja. Procenjeno je da 25% pastuva proizvodi spermu koja dobro podnosi zamrzavanje, 50% podnosi prihvatljivo, a 25% jako loše podnosi zamrzavanje (Pickett i Amann, 1993). Slično tome, velike individualne i rasne razlike se javljaju i kod nerastova tokom zamrzavanja semena. Ejakulati rase durok pokazuju bolje podnošenje zamrzavanja od onih kod nerastova rase landras, što je potvrđeno većim procentom spermatozoida sa intaktnim plazma membranama i akrozomima u uzorcima nakon

odmrzavanja uzetim od nerastova rase durok (Waterhouse i sar., 2006). Jovičić i sar. (2020) su naveli da dodavanje seminalne plazme u spermum nerastova pre krioprezervacije poboljšava otpornost spermatozoida na zamrzavanje, a kriokonzervirano seme u tečnom azotu ne treba čuvati duže od 2 godine. Krioprezervacija sperme je praktična i široko rasprostranjena strategija za očuvanje genetskog materijala priplodnjaka. Konzervacija semena nerasta dubokim zamrzavanjem omogućila bi čuvanje naslednog materijala autohtonih rasa svinja, u cilju očuvanja biodiverziteta, ali i genetski superiornih jedinki savremenih rasa. Glavni nedostatak primene ove tehnologije kod svinja je u tome što su postupci uključeni u proces krioprezervacije štetni za spermum nerasta i rezultiraju oštećenjem membrane spermatozoida, citoskeleta, membrane akrozoma i jedra, kao i hromatinskog materijala. Kriotolerancija spermatozoida je u direktnoj vezi sa sastavom plazma membrane i zavisi pre svega od odnosa holesterola i fosfolipida, kao i sadržaja nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidnoj frakciji (Jovičić i sar., 2020). Visok sadržaj polinezasićenih masnih kiselina i nizak sadržaj holesterola plazma membrane spermatozoida jedan je od glavnih razloga što spermatozoidi nerasta znatno lošije podnose zamrzavanje u odnosu na druge vrste domaćih životinja, poput bikova. Pri tome, zabeležene su razlike između nerastova različitih rasa, ali i značajne individualne razlike, tako da postoje jedinke koje primenom različitih metoda zamrzavanja uvek imaju znatno bolje rezultate vijabilnosti spermatozoida u odnosu na prosečne vrednosti vrste. Rezultati naših istraživanja na spermi savremenih rasa svinja pokazuju da se nakon dubokog zamrzavanja može dobiti prosečna pokretljivost spermatozoida od 30–40% (Maletić i sar., 2022). Ovi rezultati su u saglasnosti sa rezultatima većine drugih istraživača (Caamaño i sar., 2021), jer je vrlo teško postići motilitet spermatozoida veći od 40% nakon odmrzavanja. Međutim, značajno je istaći da preliminarni rezultati naših istraživanja pokazuju da je očuvanost integriteta hromatina u ovim uzorcima preko 90% (neobjavljeni rezultati). Očuvanost naslednog materijala duboko zamrznutog semena daje mogućnost dugotrajne *ex vivo* konzervacije. Ovako konzervirano seme se potencijalno može koristiti za *in vitro* fertilizaciju ili za veštačko osemenjavanje, pri čemu akcenat nije na broju prasadi koja se može dobiti, već na dobijanju potomstva ugroženih, retkih ili vrednih jedinki koje se zatim mogu dalje razmnožavati. Sa aspekta očuvanja autohtonih rasa svinja bilo bi od značaja ispitati eventualne razlike u zamrzavanju sperme domaćih rasa poput moravke, resavke i mangulice, jer prema rezultatima nekih autora seme mangulice znatno bolje podnosi zamrzavanje (Ghiuru i sar., 2010). Ovakvo istraživanje bi dalo dobru polaznu osnovu za formiranje banke gena autohtonih rasa svinja.

Individualne razlike su zabeležene i kod sperme bikova, mada oni generalno dobro podnose duboko zamrzavanje. Sperma bikova koja loše podnosi duboko zamrzavanje, a ti bikovi imaju dobar genetski potencijal, pakuju se u pajete sa većim brojem spermatozoida u dozi i za takve bikove napravljeni su individualni protokoli za zamrzavanje uzoraka (Parkinson i Whitfield, 1987). Kod kuja procenat graviditeta nakon osemenjavanja sa duboko zamrznutim seme-

nom (50,0–70,8%) je i dalje niži u poređenju sa osemenjavanjem svežim semenom (81,8–83,7%). Ovaj način osemenjavanja kuja omogućava značajan uspeh i može da se koristi u čuvanju naših autohtonih rasa pasa.

Banke semena se formiraju samo za jednu rasu ili za ugrožene rase. Tako na primer, španska banka semena “Principado de Asturias”, koja je osnovana 2004. godine, trenutno čuva spermum za mnoga udruženja odgajivača autohtonih rasa (Tamargo i sar., 2009). Ova banka je prvenstveno osnovana da čuva seme goveda pod nazivom “Asturiana de la Montaña” (Tamargo i sar., 2009).

Embrioni

Embriotransfer se uspešno radi kod više od 16 vrsta sisara, uključujući sve vrste stoke, tako da je banka embriona veoma dobra opcija za očuvanje genetske raznovrsnosti i nudi najbrži način za obnavljanje originalne populacije za razmnožavanje, uključujući i nuklearne i mitohondrijalne genetske informacije. Procedure za kriokonzervaciju embriona bivola, ovaca i koza uglavnom su slične tehnikama koje se koriste kod goveda (Fogarti i sar., 2000; Rodriguez Dorta i sar., 2007). Krioprezervacija embriona konja je nešto manje efikasna, jer su embrioni izuzetno osetljivi na zamrzavanje, pošto imaju visok sadržaj lipida (Ulrih i Novšari, 2002). Pod optimalnim uslovima embriotransfera kod krava (odgovarajuće sinhronizovane i dobro vođene ženke primaoca, i embrioni odličnog kvaliteta), stopu graviditeta iznosi 60–70% (Spell i sar., 2001), dok kod krmača ona jako varira od 14 do 100% (Fujino i sar., 2007). Procenat graviditeta kod koza prilikom embriotransfera duboko zamrznutog embriona iznosi od 30% do 40% (Han i sar., 2001), a kod ovaca od 60% do 75% (Bellencourt i sar., 2009), vrlo sličan procenat graviditeta je sada i kod kobila i iznosi 55–65% (Araujo i sar., 2010).

Oocite

Kao i u slučaju korišćenja zamrznutih embriona, vraćanje izgubljene rase ili genotipa korišćenjem zamrznutih oocita i zamrznutog semena ne bi zahtevalo ukrštanje. U poslednjih deset godina, značajan napredak je postignut u krioprezervaciji oocita. Dugo vremena, stopa *in vitro* fertilizacije (IVF) sa zamrznutim oocitima kod ljudi i drugih vrsta životinja je bila loša zbog oslobađanje kortikalnih granula, usled čega zona pellucida postaje neprobojna za spermatozoide, kao i zbog raspadanja deobnog vretena u metafazi II. Procenat uspešnosti IVF-a se poboljšao od uvođenja intracitoplazmatske injekcije sperme (ICSI) (Palermo i sar., 1992).

Nakon zamrzavanja i odmrzavanja oocite, viabilne oocite su potvrđene kod velikog broja životinjskih vrsta i ljudi, odnosno kod goveda (Abe i sar., 2005), svinja, ovaca, zečeva, miševa i majmuna (Critseri i sar., 1997), koza (Le Gal,

1996), konja (Hochi i sar., 1996; Maclellan i sar., 2002) i bivola (Dhali i sar., 2000). Zamrzavanje oocita ptičijih i ribljih vrsta nije bilo uspješno, uglavnom zbog velike veličine, visokog sadržaja lipida i polarne organizacije jajnih ćelija ovih vrsta životinja.

Broj potrebnih uzoraka za obnovu rasa je: 2.000 doza semena, po 100 doza semena i oocita i 200 embriona (FAO, 2012). Dobijanje ždrebadi upotrebom zamrznutih oocita kreće od se od 17 do 50% (Clerico i sar., 2021). Kod svinja, razvoj krioprezervacije oocita je ograničen, prvenstveno zbog visoke osetljivosti jajnih ćelija svinje na stres kod zamrzavanja (Appeltant i sar., 2017). Zamrzavanje oocita kuja i mačaka je slabo korišćeno zbog činjenice da se jajne ćelije slabo obnavljaju i dostižu metafazu II u uslovima kulture *in vitro*. Ovo se dešava zbog toga što za razliku od drugih vrsta, oocite kuja ovuliraju u nezreloj fazi, a nastavak mejoze se tada odvija unutar jajovoda (Songsasen i sar., 2007).

NAPREDNE PROCEDURE I POTENCIJAL U KRIOKONZERVACIJI

In vitro oplodnja duboko zamrznutim semenom

Prva telad od duboko zamrznutih embriona koji su korišćeni za IVF dobijena su u SAD (Zhang i sar., 1993). IVF tehnika zahteva dobro opremljenu laboratoriju i kvalifikovanog tehničara, a postupak uključuje uzimanje oocita iz jajnika donora i njihovu oplodnju *in vitro*. Dobijeni embrioni se drže u inkubatoru sedam ili osam dana, a zatim se zamrzavaju ili se odmah prebacuju u recipijenta koji mora biti u istom stadijumu ciklusa, kada se očekuje da stopa IVF govedih oocita bude veća od 85% (Zhang i sar., 1992). Procenat uspešnosti graviditeta kod IVF-a upotrebom ovih embriona dobrog kvaliteta obično se kreće u rasponu od 35% do 50%. Radovi o uspehu prvih IVF kod ovaca, svinja i koza pojavili su se početkom devedesetih godina (Cheng i sar., 1986; Hanada, 1985), međutim, ove procedure nisu bile široko prihvaćene od strane komercijalne stočarske industrije, pre svega zbog visoke cene same metodologije.

Intracitoplazmatska injekcija sperme (ICSI)

Početkom devedesetih godina počinje se sa istraživanjima tehnike mikroinjekcije spermatozoida u neoplođene jajne ćelije (Markert, 1983). Prvo potomstvo proizvedeno sa tehnikom ICSI u ooplazmu jajnih ćelija bilo je kod zeca (Hosoi i sar., 1988), a zatim kod krava (živa telad) u Japanu (Goto i sar., 1990). Nažalost, neke domaće vrste poput goveda pokazuju niske stope formiranja pronukleusa nakon injekcije sperme, što je dovelo do razvoja različitih protokola za veštačku aktivaciju i predtretman sperme. ICSI je obećavajuća metoda za genetsko spasavanje ugroženih i divljih vrsta (Salamone i sar., 2017).

Krioprezervacija jajnika i drugog tkiva gonade

Krioprezervacija jajnika može biti još jedan način očuvanja animalnog genetičkog resursa (AnGR). Zamrznuti jajnici ili delovi jajnika mogu se koristiti kao izvor oocita. Oociti se mogu sakupiti iz heterotopno kalemljenih jajnika (tj. kalemljenih na tkiva koja nisu jajnik) za naknadnu IVF kod proizvodnje embriona (FAO, 2012).

Embrionalne matične ćelije

Embrionalne matične ćelije su nediferencirane embrionalne progenitorne somatske ćelije koje se mogu kultivirati *in vitro* i zamrznuti za kasniju upotrebu. Prednost ovih ćelija je što se mogu zamrznuti, odmrznuti i zatim umnožavati kroz brojne ćelijske cikluse. Kod nekih životinjskih vrsta (tj. miševa i primata), tamo gde su identifikovane prave embrionalne matične ćelije, one se dobijaju relativno lako iz kultivisanih mladih embriona (unutrašnja ćelijska masa stadijuma blastociste) ili klica u ranoj fazi ćelije (npr. primordijalne zametne ćelije) i mogu se čuvati zamrznuti za buduću upotrebu (FAO, 2012). Intenzivna istraživanja poslednjih godina pokazuju da trenutno nema ubedljivih dokaza za postojanje pravih embrionalnih matičnih ćelija kod farmskih životinja (FAO, 2012).

Spermatogonije

Spermatogonije se nalaze unutar bazalnog sloja seminiferne tubule testisa i imaju sposobnost stvaranja spermatozoida. Njihov razvoj počinje pre puberteta i nastavlja se kod odraslih životinja, u kontinuiranoj replikaciji, čime se održava njihov broj u procesu poznatom kao obnova matičnih ćelija. Pokazalo se na miševima (Brinster i Zimmermann, 1994) da ove matične ćelije, kada su izolovane iz testisa životinja donora, mogu biti obrađene i korišćene za obnovu drugog testisa bez imunoodbacivanja. Tehnika prenosa spermatogonija bi se potencijalno mogla koristiti za prenošenje genetskog materijala sa jedne generacije na drugu, i kada se kombinuje sa krioprezervacijom, može biti način za čuvanje gena muških životinja (FAO, 2012).

Primordijalne germinativne ćelije

Iako su tokom godina uloženi napor da se proizvedu gamete i potomstvo od primordijalnih germinativnih ćelija (Tsunoda i sar., 1989; Chuma i sar., 2005), tek nedavno zabeležen je veći uspeh kod riba i ptica (Etches, 2010).

Somatske ćelije i kloniranje

Od prvog uspešnog kloniranja i dobijanja klona ovce Doli, ova tehnika je uspešna kod većine ispitanih sisara, ali nema značajnog uspeha kod ptica.

Tehnika je veoma atraktivna i skupa, ali omogućava upotrebu u očuvanju genetskih resursa jedne države. Stopa uspeha je veoma niska, ali glavna prednost ove tehnike je izbor životinja za očuvanje, a kasnije rekonstituisanje populacije klonova. Uzorkovanje somatskih ćelija je lakše od sakupljanja embriona, tako da bi se mogao čuvati veći broj uzoraka. Ova metoda mogla bi biti upotrebljena tamo gde nije moguće ili nije izvodljivo sakupiti embrione, jajne ćelije ili spermu (ERFP, 2003).

ZAKLJUČAK

Uzorci duboko zamrznutog semena, jajnih ćelija, embriona ili tkiva, odnosno somatskih ćelija autohtonih rasa imaju primarnu funkciju u očuvanju animalnih genetičkih resursa, koji se mogu na ovaj način čuvati neograničeno vreme. Banke gena mogu poslužiti kao primarni izvor materijala za naučnike koji vrše DNK istraživanja. Čuvanje izolovane DNK zajedno sa uzorcima spermatozoida, jajnih ćelija i embriona u banci gena omogućava značajna naučna istraživanja iz oblasti genetke i genotipizacije uzoraka koji se čuvaju jako dug vremenski period.

Zahvalnica:

Rad je podržan sredstvima Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-47/2023-01/200143).

LITERATURA

1. Abe Y, Hara K, Matsumoto M, Kobayashi J, Sasada H, Ekwall H, Rodriguez Martinez M, Sato E, 2005. Feasibility of nylon-mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biology of Reproduction*, 72, 1416–1420.
2. Appeltant R, Somfai T, Santos ECS, Dang-Nguyen TQ, Nagai T, Kikuchi K, 2017. Effects of vitrification of cumulus-enclosed porcine oocytes at the germinal vesicle stage on cumulus expansion, nuclear progression and cytoplasmic maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, 29, 2419–2429.
3. Araujo GHM, Rocha Filho AN, Burns SD, Burns CM, Moya-Araujo CF, Meira C, 2010. Pregnancy rates after vitrification, warming and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction Science* 121 (suppl), S299–300.
4. Bettencourt EM, Bettencourt CM, Silva JCE, Ferreira P, Matos CP, Ramao RJ, 2009. Fertility rates following the transfer of ovine embryos cryopreserved using three protocols. *Small Ruminant Research*, 82, 112–6.
5. Brinster RL, Zimmermann JW, 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Science*, 91, 11298–11302.

6. Caamaño JN, Tamargo C, Parrilla I, Martínez-Pastor F, Padilla L, Salman A, Fueyo C, Fernández Á, Merino MJ, Iglesias T, 2021. Post-thaw sperm quality and functionality in the autochthonous pig breed Gochu Asturcelta, *Animals*, 11, 1885.
7. Cheng WTK, Moor RM, Polge C, 1986. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 25, 146 (abstr.).
8. Clérico G, Taminelli G, Veronesi JC, Polola J, Pagura N, Pinto C, Sansinena M, 2021. Mitochondrial function, blastocyst development and live foals born after ICSI of immature vitrified/warmed equine oocytes matured with or without melatonin. *Theriogenology*, 160, 40–49.
9. Critser JK, Agca Y, Gunasena KT, 1997. The cryobiology of mammalian oocytes, *In Karow A, Critser JK (eds): Reproductive tissue banking: scientific principles*, 329–357, San Diego, CA, USA, Academic Press.
10. Ghiuru FV, Ioan L, Roman I, Hettig A, Marius Z, Miclea V, 2010. Antioxidant medium for mangalita boar semen cryopreservation. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, Animal Science Biotechnology*, 67, 1–2.
11. Dhali A, Manik RS, Das SK, Singla SK, Palta P, 2000. Effect of ethylene glycol concentration and exposure time on post-vitrification survival and in vitro maturation rate of buffalo oocytes. *Theriogenology*, 50: 521–530.
12. Etches R, 2010. (Personal communication).
13. ERFP, 2003. Guidelines for the constitution of national cryopreservation programmes for farm animals, by SJ Hiemstra, ed. Publication No. 1 of the European Regional Focal Point on Animal Genetic Resources.
14. FAO, 2012. Cryoconservation of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12. Rome.
15. Fogarty NM, Maxwell WMC, Eppleston J, Evans G, 2000. The viability of transferred sheep embryos after long-term cryopreservation. *Reproduction, Fertility and Development*, 12, 31–37.
16. Fujino Y, Kikuchi K, Nakamura Y, Kobayashi H, Yonemura I, Suzuki M, 2007. Batchwise assessment of porcine embryos for cryotolerance. *Theriogenology*, 67: 413–22.
17. Goto K, Hinoshita A, Takuma Y, Ogawa K, 1990. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Veterinary Record*, 127, 517–520.
18. Han Y, Meintjes M, Graff K, Denniston R, Zhang L, Ziomek C, et al. 2001. Caprine offspring born from fresh and frozen-thawed in vitro-produced embryos. *Veterinary Record*, 149, 714–716.
19. Hanada A, 1985. In vitro fertilization in goat. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 31, 21–26.
20. Hochi S, Kozawa M, Fujimoto T, Hondo E, Yamada J, Oguri N, 1996. In vitro maturation and transmission electron microscopic observation of horse oocytes after vitrification. *Cryobiology*, 33, 300–310.
21. Jovičić M, Chmelíková E, Sedmíková M, 2020. Cryopreservation of boar semen, *Czech Journal of Animal Science*, 65, 2020 (04), 115–123.
22. Le Gal F, 1996. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes frozen at the germinal vesicle stage. *Theriogenology*, 45, 1177–1185.
23. Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Scoggin CF, Bruemmer JE, Squires EL, 2002. Pregnancies from vitrified equine oocytes collected from superstimulated and non-stimulated mares. *Theriogenology*, 58, 911–919.

24. Maletić M, Vakanjac S, Stanimirović Z, Blagojević J, 2022. Mogućnost upotrebe zamrznutog semena nerasta modifikacijom osnovnog dela razređivača, Zbornik kratkih sadržaja 19. simpozijuma Zdravstvena zaštita, selekcija i reprodukcija svinja, 02–03. jun, Srebrno jezero – Veliko Gradište, Srbija.
25. Markert CL, 1983. Fertilization of mammalian eggs by sperm injection. *Journal of Experimental Zoology*, 228, 195–201.
26. Palermo G, Joris H, Devroey H, Van Steirteghem AC, 1992. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, 17–18.
27. Parkinson TJ, Whitfield CH, 1987. Optimisation of freezing conditions for bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 27, 781–797.
28. Pickett BW, Amann RP, 1993. Cryopreservation of Semen. In McKinnon AO and Voss JL (eds), *Equine Reproduction*, Lea & Febiger, Philadelphia, 769–789.
29. Rodríguez-Dorta N, Cognié Y, González F, Poulin N, Guignot F, Touzé J, Baril G, Cabrera F, Álamo D, Batista M, 2007. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. *Theriogenology*, 68, 908–913.
30. Salamone DF, Canel NG, Rodríguez MB, 2017. Intracytoplasmic sperm injection in domestic and wild mammals. *Reproduction*, 154(6), F111–F124.
31. Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC, 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 56, 287–97.
32. Songsasen N, Wildt DE, 2007. Oocyte biology and challenges in developing In Vitro maturation systems in the domestic dog. *Animal Reproduction Science*, 98, 2–22.
33. Tamargo C, de la Fuente J, Rodríguez A, Pérez-Garnelo SS, Fernández A, Benito JM, Hidalgo CO, 2009. Asturian local breeds, a germplasm bank. *Archivos de Zootecnia*, 58, 529–532.
34. Uchoa DC, Silva TF, Mota Filho AC, Silva LD, 2012. Intravaginal artificial insemination in bitches using frozen/thawed semen after dilution in powdered coconut water (ACP-106c). *Reproduction in domestic animals, Zuchthygiene* 47(suppl 6), 289–292.
35. Ulrich P, Nowshari M, 2002. Successful direct transfer of a deep frozen-thawed equine embryo. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 109, 61–62.
36. Waterhouse KE, Hofmo PO, Tverdal A, Miller RR, 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction*, 131(5), 887–894.
37. Zhang L, Denniston RS, Godke RA, 1992. A simple method for in vitro maturation, in vitro fertilization, and co-culture of bovine oocytes. *Journal of Tissue Culture Methods*, 14, 107–112.