

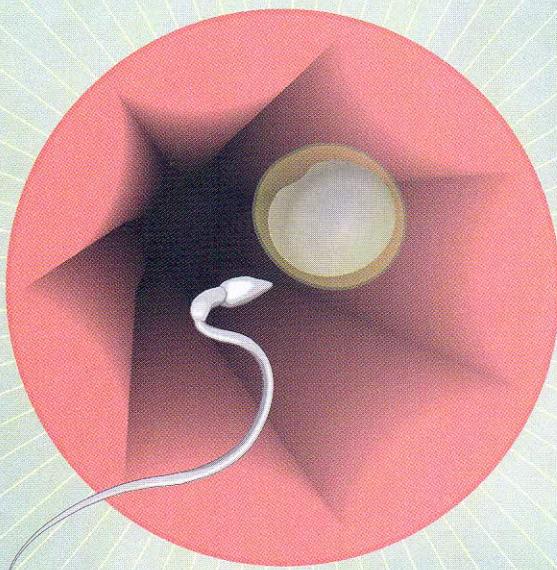


UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

75
ГОДИНА
ФАКУЛТЕТА
ВЕТЕРИНАРСКЕ
МЕДИЦИНЕ

REPRODUKCIJA DOMAČIH ŽIVOTINJA

Zbornik predavanja



Divčibare,
13-16. oktobar 2011.

NAUČNI SIMPOZIJUM „REPRODUKCIJA DOMAČIH ŽIVOTINJA“
SCIENTIFIC SYMPOSIUM “REPRODUCTION OF DOMESTIC ANIMALS”
– Zbornik radova / Proceedings –

Organizatori / Organized by

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu
Faculty of veterinary medicine, University of Belgrade
Deapartmet of reproduction, fertility and artificial insemination

Počasni predsednik / Honorary Chairmen

Stojić Velibor

Predsednik / Chairmen

Pavlović Vojislav

Organizacioni odbor / Organizing Committee

Gvozdić Dragan, Vakanjac Slobodanka, Jakovljević Goran, Perković Stevan,
Veselinović Spasoje, Mandić Rajko, Jakić Dobrila, Stojanović Dragica, Špegar Vladimir,
Debeljak Zoran, Marinković Zoran, Vaić Dubravko, Stepanović Petar

Naučni odbor / Scientific Committee

Lazarević Miodrag, Pavlović Miloš, Petrujić Tihomir, Vuković Dragan, Jovičin Milovan,
Marinković Miroslav

Sekretar / Secretary

Gvozdić Dragan

Sekretarijat / Secretariat

Gabrić Maja, Đurić Miloje, Maletić Milan, Nedić Svetlana

Urednik / Editor

Lazarević Miodrag

Izdavač

Naučna KMD, Beograd

Štampa

Naučna KMD, Beograd

Tiraž: 400 primeraka

Grafički dizajn i izrada korica

Jovanović B. Ivan



PRIMENA NOVIJIH BIOTEHNIČKIH METODA ZA POBOLJŠANJE REPRODUKTIVNE EFIKASNOSTI OVACA

**APPLICATION OF NOVEL BIOTECHNICAL METHODS FOR IMPROVEMENT
OF OVINE REPRODUCTIVE EFFICIENCY**

**Dovenski Toni, Petkov Vladimir, Trojačanec Plamen, Mickov Ljupčo,
Atanasov Branko, Nikolovski Martin, Kočoski Ljupče***

*Fakultet veterinarske medicine Skopje, Univerzitet Sv. Kiril i Metodij, Skopje
R. Makedonija*

**Fakultet Biotehničkih nauka, Univerzitet Sv. Kliment Ohridski, Bitola, R. Makedonija*

Kratak sadržaj

Napredak u proučavanju reproduktivne biologije ovaca je jedan od važnih preduslova za dobar menadžment proizvodnje i reprodukcije na ovčarskim farmama. Upotreboom vrednih naučnih saznanja iz ove oblasti, ustanovljene su brojne biotehničke metode za kontrolu reproduktivnog procesa ovaca. Neke od ovih metoda su već primenjuju u širokoj praksi, dok druge tek treba da budu uvedene.

Ovaj revijalan rad ima za cilj da prikaže trenutnu situaciju u primeni novijih biotehničkih metoda u reprodukciji ovaca, odnosno njihove mogućnosti za poboljšanje reproduktivne efikasnosti na našim farmama. U radu su razmotreni najvažniji biotehnički postupci koji se primenjuju u širokoj praksi: ubrzavanje puberteta, sinhronizacija estrusa i ovulacije, programirano veštaško osemenjavanje svežim ili kriokonzerviranim semenom, intrauterino laparoskopsko V.O., rana dijagnostika graviditeta i embriotransfer. Ukratko su obrađene i naprednije metode asistirane reprodukcije, kao što su: seksiranje semena, in vitro proizvodnja embriona, kloniranje i proizvodnja transgenih životinja.

Ključne reči: biotehnologija, embriotransfer, laparoskopija, ovca, V.O.

Summary

Current progress in knowledge of ovine reproductive biology is an essential precondition for management of production and reproduction on sheep farms. Using plenty of valuable scientific information a complex of biotechnical methods for control and adjustment of the reproduction process in sheep have been

established. Some of these methods have been implemented in the practice, however other still have to be introduced to the practitioners. The aim of this article is to give an overview of the current situation in implementation of novel biotechnical methods in sheep reproduction, underlying possibilities for improvement of reproductive efficiency of sheep flocks. The most important biotechnical procedures, such as: induction of puberty, synchronization of estrus and ovulation, programmed artificial insemination by fresh or frozen/thawed ram semen, laparoscopic intrauterine A.I., early pregnancy diagnostics and embryo transfer, have been considered. Advanced methods of assisted reproduction: semen sexing, in vitro production of embryos, cloning and production of transgenic sheep, have been briefly described.

Key words: A.I., biotechnology, embryo transfer, laparoscopy, sheep

Biotehničke metode koje se primenjuju u reprodukciji, poznate i kao metode asistirane reprodukcije, podrazumevaju različite postupke kojima se poboljšava genetska vrednost domaćih životinja i povećava broj superiornih genotipova. One predstavljaju kombinaciju naučnih saznanja iz oblasti reproduktivne fiziologije, endokrinologije, ćelijske i molekularne biologije i genomike. Poslednjih decenija prošlog milenijuma i početkom ovog, reproduktivna biotehnologija je prošla kroz veoma dimamičan razvoj. Ovo se naročito odnosi na razvijanje tehnologija za manipulaciju s embrionima, kao što su MOET (multipla ovulacija i embrio transfer) i IVP (*in vitro* proizvodnja embriona), pa sve do procedura za kloniranje sa somatskim ćelijama ili "nuclear-transfer" i proizvodnje transgenih životinja. S druge strane, postignut je napredak i u tehnologiji zamrzavanja semena, a poslednjih godina veoma su aktuelna istraživanja u pogledu zamrzavanja tzv. seksiranog semena. Najveći deo ovih istraživanja sproveden je na govedima, s obzirom na njihovu ekonomsku vrednost, posebno na kravama mlečnih rasa (Gordon 2003, Bols i sar. 2010, Aleksander i sar. 2010, Dovenski 2011).

Razvoj reproduktivne biotehnologije kod malih preživara, posebno kod ovaca, uglavnom je bio usmeren na metode za sinhronizaciju estrusa i ovulacije, ranijeg uvođenja ženske jagnjadi u reproduktivni ciklus, tehnologije zamrzavanja semena, intrauterinog osemenjavanja pomoću laparoskopije, rane dijagnostike graviditeta ultrazvukom, kao i embrio transfera (Popovski i sar., 2000).

Ovčarska proizvodnja u Makedoniji zauzima značajno mesto, iako je još uvek velikim delom bazirana na tradicionalnom nomadskom načinu stočarenja. Među najvažnije izvozne proizvode u oblasti agrara spadaju ovčji sir i jagnjeće meso, koje se najviše izvozi na tržišta u regionu ali i u neke zemlje članice EU (Italija, Grčka) posebno za vreme velikih Hrišćanskih praznika Uskrsa i Božića. Da bi postigla što veća proizvodnja, kao i zadovoljavajući kvalitet, pored drugih preduslova (ishrana, selekcija, zdravstvena zaštita) neophodna je i primena savremenih biotehničkih metoda za intenzifikaciju procesa reprodukcije ovaca.

Više od četiri decenije traje razvoj ovih metoda na ovčarskim farmama u Makedoniji, počevši od prvih eksperimenata za sinhronizaciju estrusa vaginalnim sružnicama i standardiziranja doze PMSG-a u tu svrhu, pa sve do primene laparoskopskog intrauterinog osemenjavanja i MOET-a.

U nastavku ovog teksta biće prikazane najvažnije savremene metode reproduktivne biotehnologije koje nalaze ili bi mogle naći primenu u ovčarskoj proizvodnji, kako u Makedoniji, tako i u regionu.

Na početku treba spomenuti zbog čega bi se uopšte primenjivale ove metode, koje su uglavnom hormonalne i koje su njihove prednosti u odnosu na ostale metode (efekat mužjaka, manipulacija fotoperiodom i ishranom). Ukratko, ove metode sprečavaju neke neželjene posledice koje mogu da se javе na farmama, kao što su:

1. Razmnožavanje u bliskom krvnom srodstvu, koje je često kod „haremског“ parenja
2. Zaostajanje u telesnom razvoju ženki koje ostaju gravidne kao nezrele jedinke,
3. Jagnjenje u periodu nedostatka stočne hrane, sezonskog parazitizma ili perioda pogodnih za druga masovna oboljenja
4. Jagnjenje ovaca u periodu kada je izražen nedostatak radne snage
5. Učestali embrionalni i fetalni gubitci kod ovaca oplođenih u periodu kada je njihova telesna kondicija slaba zbog sezonskog nedostatka hrane

Ranije uvođenje u reprodukciju

Ranije uvođenje u reprodukciju "upola zrele" ženskih jagnjadi, pobuđivalo je poseban interes farmera u nastojanju povećanja proizvodnje i rentabilnosti. Uprkos činjenici da je pubertet ovaca uglavnom genetski predodređen, ipak se tok hormonalnih promena koje se dešavaju pre postizanja puberteta može menjati zajedno s promenama spoljašnjih faktora, posebno imajući u vidu da se ovca razmnožava sezonski. Pored ostalih načina koje mogu ubrzati pubertet kod jagnjadi, Popovski i sar. (2000) preporučuju primenu progestagenskog tretmana: intravaginalna aplikacija FGA 40 mg vaginalnim sružnicama, u trajanju od 14 dana, u kombinaciji s 400 i.j. eCG (raniji naziv PMSG) na dan vađenja. Njihovi rezultati su ukazali da se estrus javlja kod $87.5 \pm 4.9\%$ tretiranih grla i to najčešće između 48. i 60. časa; sa zadovoljavajućim procentom graviditeta od 76.2 ± 6.6 i paritetom od 1.19 jagnjadi po ovci. Ipak, autori zaključuju da je telesni razvoj jedinki veoma važan za određivanje momenta prvog pripusta i ovim istraživanjima je dokazano da je to najbolje uraditi kada jagnje postigne $78.6 \pm 4.1\%$ od težine majke.

Sinhronizacija i indukcija estrusa i ovulacije

Sinhronizacija i indukcija estrusa i ovulacije kod ovaca je jedna od najčešće primenjivanih biotehničkih metoda kod nas i u svetu. Pored prirodnih metoda

koje smo već pomenuli, ali koje ne daju zadovoljavajuće rezultate, posebno u pogledu distribucije estrusa, od farmakoloških metoda najbolji uspeh je imala intravaginalna aplikacija sintetskih progestagena, koja zamenjuje ili produžava funkciju žutog tela. Trajanje ovog tretmana je 12 dana, bez razlike da li se izvodi u sezoni parenja ili izvan nje. Doza koja se primenjuje je, od nekadašnjih 40 mg, razvojem biološki aktivnijih progestagena (npr. Flugestone acetate) svedena na 20 mg, sa skraćenim trajanjem karence za meso na 2 dana i bez karence za mleko. Na dan vađenja spužvica, treba izvršiti i.m. aplikaciju standardne doze od 500 I.J. eCG (equine Chorionic Gonadotrophine), da bi se estrus javio 2 - 3 dana kasnije. Uspešnost indukcije estrusa se kreće od 70 - 80% izvan sezone, odnosno do 90% pa i više u sezoni parenja, zavisno od telesne kondicije životinje, zdravstvenog i laktacijskog statusa (Popovski i sar. 1997, Zamfiresku 2010).

Veštačko osmenjavanje

Programirano V.O. je najbolje napraviti izmedju 48. i 52. sata posle vadjenja spužvica, ako se radi transcervikalno, odnosno 52-56 sata ako vršimo laparoskopsko intrauterino osmenjavanje. Postignuti su zadovoljavajući rezultati (više od 70%) prilikom cervikalnog osmenjavanja primenom svežeg semena razređenog glukozo-fosfatnim razređivačem, ali slabiji zamrznutom spermom.

Kao jedan od najvažnijih razloga slabe fertilitosti ovaca, čak i prilikom prirodnog parenja, navodi se otežani transport sperme kroz grlić materice (Boland i sar. 1983). Ovaj problem „cervikalne barijere“ može se prevazići aplikacijom semena direktno u rog materice pomoću laparoskopske tehnike, koju su prvi primenili Killen i Caffery 1982.

Laparoskopsko intrauterino osmenjavanje ovaca se sprovodi na specijalnim stolovima za tu namenu, postavljanjem životinja u leđni položaj s glavom prema dole. Najpre se postavlja troakar za uvodjenje laparoskopa (prečnik 7 mm) i to 7-10 cm ispred vimena i 5-10 cm lateralno od *linea alba*. Ovaj troakar je povezan sa pumpom za insuflaciju sterilnog CO₂, koji se uvodi u trbušnu šupljinu da bi mogli odeliti unutrašnje organe od zida i lakše vizuelizovali unutrašnjost abdominalne i pelvisne šupljine. Drugi troakar promera 5 mm se uvodi sa suprotne strane na istoj udaljenosti kao i prvi, da bi se zatim kroz njega uvkao metalni instrument za osmenjavanje sličan „pistoletu“ za V.O. krava. U njegovoj unutrašnjosti je smeštena plastična navlaka za jednokratnu upotrebu u kojoj se nalazi pajeta sa semenom. Na njenom vrhu nalazi se kratka igla kojom se probija zid roga materice i ulazi u njen lumen, gde se vrši deponiranje semena. Zbog mogućih ovulacija na oba jajnika, po pravilu se deponovanje semena vrši u oba roga, bez prethodnog pregleda jajnika. Treba paziti da se ne izazove krvarenje u lumen roga, koje može imati negativan efekat na fertilitet sperme (Dovenski sar. 1997).

Primena laparoskopije u reproduktivnoj tehnologiji ovaca u Makedoniji počela je u početkom 90-ih godina 20. veka, najpre u eksperimentalne svrhe, da bi se kasnije raširila i na komercijalnim farmama. Primenom zamrznutog odrmrznutog semena postignuti su veoma ohrabrujući rezultati koncepcije; 45% ako se radi izvan sezone, odnosno 60% u sezoni razmnožavanja (Petkov i Dovenski 2007).

MOET (višekratna ovulacija i presađivanje embriona)

Iako je ovaj postupak najčešće primenjivan kod mlečnih krava, moguće je da se sproveđe i kod genetski vrednih grla ovaca, a naročito je preporučljiv prilikom poslova kupoprodaje gotovih genoma. Njegova prednost je što su dobijeni embrioni oslobođeni od patogena, ako se sprovode preporuke međunarodnog ET društva (IETS) za njihov tretman pre zamrzavanja. Kod ovaca MOET program podrazumeva inicijalni 12 - 14 dnevni progestagenski tretman, sa dodatnom višekratnom aplikacijom FSH preparata, počevši 2 dana pre vađenja implanta/spužvica (Gonzalez-Bulnes i sar. 2004). Ranije se za izazivanje superovulacije koristio PMSG, međutim njegova upotreba je napuštena zbog nekonzistentnih rezultata i slabijeg kvaliteta embriona. Dobijanje embriona u *in vitro* sredini se obavlja ispiranjem materice PBS medijumom 6 - 7 dana posle estrusa, uobičajenom hirurškom metodom. Zbog mogućih adhezija i štetnog uticaja na embrione, preporučuje se primena laparoskopskog ispiranja uterusa. Procedura je slična kao i kod osemenjavanja, s tim da se koristi još jedan troakar, kroz koji se uvodi instrument kojim se fiksira rog materice (Nellenshulte i Nieman, 1992). Ispiranje se obavlja relativno jednostavno upotrebom trosmernog balon katetera (Ralchev i sar. 2003). Ovom tehnikom moguće je ponavljati ispiranje i do 7 puta kod iste životinje (Baril et al., 1996).

Rana dijagnostika graviditeta ultrazvukom

Rano i sigurno utvrđivanje graviditeta je jedan od imperativa svakog farmera, pa i u ovčarskoj proizvodnji. Primenom ultrazvučnog aparata, moguće je postaviti dijagnozu rektalnom sondom već 24. dana posle V.O., odn. parenja, odnosno 35. dana ako koristimo abdominalnu sondu. Istraživanjem koje je izvršeno na 3839 jedinki, Popovski i sar. (1996) su utvrdili opštu tačnost od 95.43% odn 97.78% prilikom rektalne ili abdominalne dijagnostike, respektivno. Senzitivnost metode je 97.59% i 99.16% a specifičnost 92% i 100%, respektivno. Veoma je važno pomenuti, da se ovim pregledom u ranoj fazi može takođe utvrditi dvojna ili trojna gestacija. To je podatak koji pomaže farmeru u menadžerskim funkcijama i usmerava ga da posveti više pažnje ovakvim jedinkama u pogledu držanja, ishrane i organizacije jagnjenja.

Naprednije biotehničke metode

Na kraju, ukratko ćemo spomenuti i neke još naprednije metode asistirane reprodukcije, koje su još u razvoju i u zemljama s naprednjim stočarstvom, ali koje pobuđuju ozbiljno interesovanje naučnog sveta.

Seksiranje semena

Seksiranje semena je proces kojim se razdvajaju spermatozoidi iz ejakulata u dve subpopulacije, jednu sa „X“ hromozomima i drugu u kojoj su spermatozoidi sa „Y“ hromozomom. Više različitih tehnoloških metoda se primenjuje u tu svrhu, a kao najefikasnija se pokazala *protočna citometrija (flow cytometric system)*. Iako se najčešćim delom primenjuje za proizvodnju bikovskog semena, postignuti su ohrabrujući početni rezultati i sa spermom od ovnova (Evans i sar. 2004). Efikasnost razdvajanja spermatozoida je iznad 95 %, međutim nedostatak je to što je metoda jako spora i procenat koncepcije je još uvek jako nizak. Naime, fertilnost sprematozoida se smanjuje tokom procedure obeležavanja, prolaska kroz električno polje i razređivanja. Za poboljšanje rezultata osemenjivanja Hollinshead i sar. (2003) preporučuju intrauterinu aplikaciju seksiranog semena u sinhronizovanom estrusu.

In vitro proizvodnja embriona

In vitro proizvodnja embriona kod ovaca, je procedura slična onoj koja se sprovodi kod goveda, posebno mlečnih krava. Sakupljanje jajnih ćelija se najčešće vrši na jajnicima dobijenim sa klanice, ali je moguća i od živih donora. Za razliku od krava, kod kojih je dobro razrađena procedura ultrazvučno vođene aspiracije oocita, t.zv. OPU (ovum pick-up), kod ovaca se primenjuje laparoskopska tehnika aspiracije jajnih ćelija posle gonadotropinske stimulacije (Alberio i sar. 2002). Koriste se različite procedure i medijumi u pojedinim fazama ove tehnologije (*in vitro* maturacije, ferilizacije i kultiviranja embriona) analogno onima koje se upotrebljavaju kod krava.

Kloniranje i proizvodnja transgenih životinja

Ovca je prva vrsta domaće životinje na kojoj je uspešno napravljeno kloniranje uz dobijanje živog potomstva (čuvena ovca Dolly), nakon transplantiranja somatske ćelije vimena odrasle životinje u anukleiranu jajnu ćeliju (Wilmut i sar. 1997). Posle toga je započela nova era reproducive tehnologije, rušeći standardna shvatanja o reproduktivnim i somatskim ćelijama, ali i otvarajući nove mogućnosti istraživačima i farmaceutskoj industriji. Izvršena su kloniranja na drugim vrstama životinja i sa drugim somatskim ćelijama, međutim uspeh dobijanja vitalnog potomstva je veoma slab. Razlozi za učestale abnormalnosti kloniranog potomstva, visoki prenatalni kao i posnatalni gubici,

objašnjavaju se izmenjenom ekspresijom gena i hromatinskim modifikacijama prilikom remodeliranja i reprogramiranja koje vrši citoplazma ćelije recipijenta (Reik i Dean 2002).

Poslednjih godina istraživanja su fokusirana na proizvodnju transgenih životinja, odnosno životinja koje mogu da luče rekombinantne proteine u svom mleku. Ovce su takođe bile predmet eksperimenata u ovom smeru, s ciljem dobijanja farmaceutskih proizvoda za humanu medicinu, pa su dobijeni rekombinantni humani proteini: faktori zgrušavanja VIII i IX, antigen protiv malarije i dr.

U zaključku možemo konstatovati da predstavljene biotehničke metode koje se primenjuju u reprodukciji ovaca, mogu biti koristan alat u sveukopnom menadžmentu na ovčarskim farmama, s ciljem povećanja proizvodnje i efikasnijeg iskorišćavanja reproduktivog kapaciteta jedinki.

Literatura:

1. Alberio R, Olivera J, Roche A, Alabart J, Folch J, 2002, Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes, *Small Rumin Res*, 46, 81-7.
2. Alexander B, Mastromonaco G, King WA, 2010, Recent Advances in Reproductive Biotechnologies in Sheep and Goat, *J Veterinar Sci Technol*, 1,101.
3. Boland MP, Crosby TF, Gordon I, 1983, Factors influencing the superovulatory response in sheep, *Theriogenology*, 19, 114.
4. Bols PEJ, Langbein A, Goovaerts IGF, Leroy JL, 2010, Biotechnology of Reproduction in Farm Animals with an Emphasis on Cattle Assisted Reproductive Techniques, Proceed. Int. Conf., Adapting Animal Production to Changes for a Growing Human Population, 45-60.
5. Gordon I, 2003, Laboratory production of cattle embryos, Second Edition. CABI publishing, Oxon, UK – Cambridge, USA.
6. Dovenski T, Popovski K, Petkov V, Mickovski G, Kocoski Lj, Trojacanec P, Stojanovski B, 1997, Usporedba uspjesnosti intrauterine i intracervikalne inseminacije koza duboko smrznutom spermom, Prvi Hrvatski Veterinarski Kongres, Zbornik radova, Cavtat, Hrvatska.
7. Dovenski T, Trojacanec P, Petkov V, Popovska-Percinic F, Kocoski Lj, 2011, Using of ultrasound guided Ovum Pick-Up (OPU) in Bovine Embryo Industry as an alternative to superovulatory treatment, 2nd Conference of Balkan Network for Animal Reproduction Biotechnology, Proceedings, 36-9 Sofia, Bulgaria
8. Evans G, Hollinshead FK, Maxwell WMC, 2004, Preservation and artificial insemination of sexed semen in sheep, *Reprod Fertil Dev*, 16, 455-64.
9. Gonzalez-Bulnes A, Baird DT, Campbell BK, Cocero MJ, Garcia-Garcia RM, 2004, Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats, *Reprod Fertil Dev*, 16, 421-35.

10. Hollinshead FK, Gillan L, O'Brian JK, Evans G, Maxwell WMC, 2003, *In vitro* and *in vivo* assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing, *Reprod Fertil Dev*, 15, 351-9.
11. Killen ID, Caffery GJ, 1982, Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope, *Aust Vet J*, 59,95.
12. Nellenschulte E, Nieman H, 1992, Collection and transfer of ovine embryos by laparoscopy, *Anim Reprod Sci*, 27, 293-304.
13. Popovski K, Georgievski B, Mickovski G, Petkov K, Kocoski Lj, Dovenski T, Petkov V, Trojacanec P, 1996, Control of reproduction on Macedonian sheep, 13th International Congress on animal Reproduction (ICAR), P4-30, 1996 Sydney Australia.
14. Popovski K, Georgievski B, Mickovski G, Petkov K, Kocoski Lj, Dovenski T, Petkov V, Trojacanec P, 1997, Biotechnology of reproduction in sheep, *Mac J Reprod*, 3, 1, 73- 80.
15. Popovski K, Mickovski G, Dovenski T, Kočoski Lj, Trojačanec P, Petkov V, Mickov Lj, Biotehnologija razmnožavanja ovaca i koza, II Savetovanje iz kliničke patologije i terapije životinja "Clinica veterinaria" Zbornik radova, 12-20, Budva, S.R. Jugoslavija, 2000.
16. Petkov V, Dovenski T, 2007, Laparoscopic technique of Artificial Insemination with frozen semen in small ruminants. 9. Symposium on Veterinary Clinical Pathology and Therapy "Clinica Veterinaria" Palic, Serbia
17. Reik W, Dean W, 2002, Epigenetic reprogramming: back to the beginning. *Nature*, 420, 127.
18. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH, 1997, Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells, *Nature*, 385, 810-3.
19. Zamfirescu S, 2010, The retrospective results of the research developments regarding reproduction biotechnologies in sheep and goat in Romania, *Rom Biotechnol Lett*, 15, 3, Supplement.