

İN VİTRO SIĞIR EMBRİYOSU ÜRETİM VE TRANSFERİ

In vitro Embryo Production and Transfer in Cattle

Numan AKYOL*

Sedat Hamdi KIZIL*

Tahir KARASHAHİN*

*Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, Lalahan-Ankara, Türkiye

Geliř Tarihi : 27.06.2005

Kabul Tarihi : 17.04.2007

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, mezbahadan elde edilen siğır oositlerinden in vitro koşullarda embriyo elde edilmesi ve bunların taşıyıcı ineklere transfer edilerek yavru elde etme imkanlarının araştırılmasıdır.

Oositlerin in vitro maturasyonu için, %10 Fötal Buzağı Serumu (FCS) ve 2µg/ml FSH katkı TCM-199 ile 20-22 saat inkubasyon periyodu, in vitro fertilizasyonu amacıyla Brackett ve Oliphant (BO) mediumu ile direkt yıkama metodu ve 5-6 saat inkubasyon süreci, embriyoların in vitro kültürü amacıyla aminoasitli Charles Rosencrans (CR1aa) mediumu kullanılmıştır. Oositlerin kültür periyotlarında 39 °C, % 5 CO₂ ve % 95'in üzerinde nem sağılayan inkubator kullanılmıştır. 12 mezbaha ziyaretinde 230 ovaryum toplanmış, bunlardan aspirasyon ve dilimleme yoluyla, 1661 iyi kalite (A ve B), 498 C kalite ve dejenere oosit elde edilmiştir. Ovaryum başına; 7.22 iyi kalite, 2.16 C kalite ve dejenere oosit olmak üzere toplam 9.38 oosit elde edilmiştir. Morfolojik kalite sınıflandırmasına göre A ve B kalite olan inek oositleri embriyo elde edilme sürecine alınmıştır. Çalışma sonucunda, % 92.0 maturasyon; % 72.0 bölünme ve % 34.0 morula-blastosiste gelme oranına ulaşılmıştır. Rastgele seçilen oositlerin ölü spermatozoonlarla gerçekleştirilen fertilizasyon işlemlerinin ardından partenogenetik bölünme oranı % 4.5 olarak bulunmuştur. İn vitro embriyoların beş taşıyıcıya taze olarak transfer edilmesini izleyen 50. günde ultrasonla yapılan muayenede iki gebelik tespit edilmiş bunlardan sağılıklı bir buzağı doğumu gerçekleşmiştir.

Sonuç olarak, mezbahalardan alınan ovaryumların oosit kaynağı olarak kullanılabilceğı, invitro fertilizasyon ve embriyo transferi ile sağılıklı buzağı elde edilebileceğı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : İn vitro, Embriyo, Maturasyon, Fertilizasyon, Siğır, Transfer.

ABSTRACT

The aim of the study is to produce in vitro cattle embryos and to transfer to recipient cows then to provide calves.

TCM-199 + 10% Fetal Calf Serum (FCS) + 2µg/ml FSH and 20-22 hours incubation period were used for in vitro maturation. Direct washing method by Brackett and Oliphant (BO) medium and 5 or 6 hours incubation period were used for in vitro fertilization. Charles Rosencrans (CR1aa) medium was used for in vitro emryo culture. Oocytes incubation was done in 39 °C, 5 % CO₂ and over than % 95 humidity for each IVM, IVF and IVC procedures. 230 ovaries were collected after 12 visited to sloughthouse. 1661 A and B quality oocytes and 498 C quality and degenerated oocytes were collected by aspirating and slicing of ovaries. 7.22 A and B quality oocytes and 2.16 C quality and degenerated oocytes totally 9.38 oocytes provided from per ovaries. Only A and B quality oocytes were used for production of in vitro embryos. Maturation rate was 92.0 %, cleavage rate was 72.0 % and coming into morulae-blastocyst stage rate was 34.0 %. Killed spermatozoa were used to diagnosis of the parthenogenetical cleavage rate. Parthenogenetic cleavage rate was 4.5 % after taken some oocytes sample randomly. In vitro produced embryos were transferred to five recipient cows. Two pregnancies were diagnosed by ultrasound imaging in the 50th day after transfers then one healthy calf delivered.

Key Words : In vitro, Embryo, Maturation, Fertilization, Cattle, Transfer.

GİRİŐ

Günümüzde hayvan ıslahı ile ilgili olarak çok sayıda biyoteknolojik yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan başlıcası, suni tohumlama ve süperovulasyonla birlikte gerçekleştirilen embriyo transferidir. Ancak 1980'li yıllardan itibaren in vitro fertilizasyon tekniğı

de bu konuda uygulama alanı bulmuştur. Günümüzde, dünyada üretilen embriyoların %15 kadarını in vitro koşullarda üretilen embriyolar oluşturmaktadır. İslah çalışmalarının yanı sıra, konuyla ilgili bilimsel çalışmalarda da çok sayıda embriyo kullanılmaktadır.

Dolayısıyla embriyo üretiminin artırılması açısından biyoteknolojik yöntemler geliştirilmesinin önemi ortaya çıkmaktadır (2, 10).

İneklerde süperovulasyon tekniğine kıyasla üstün olduğu kabul edilen in vitro embriyo üretim teknikleri sayesinde mezbahada kesilen hayvanlardan veya üstün genetik karakterli inek ve düvelerden çok sayıda oosit toplanarak laboratuvarında embriyo elde edilebilmektedir. Bu metotlar sayesinde prepubertal düvelerden, gebe, repeat breeder ve genital kanallarında fizyolojik bozukluklara sahip hayvanlardan da yararlanmak olasıdır (14). Yönteme bağlı olmakla birlikte ovaryumdaki foliküllerden elde edilen oosit sayısı 3-40 arasındadır. Mature edilen oositlerin %60-90'ı maturasyonda başarılı olmakta, bunlardan %20-50'si Morula-Blastosist aşamasına ulaşabilmektedir (8).

Türkiye'de İn Vitro Fertilizasyon (İVF) çalışmalarına, 1983 yılında tavşanlarda başlanmış, 2002 yılında ilk in vitro koşullarda üretilmiş embriyolardan sağlıklı kuzular alınmıştır (3, 15).

Bu çalışmanın amacı, sığırlarda in vitro embriyo üretimi ve transferi ile gebelik elde etme imkanlarının araştırılmasıdır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Araştırma Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'nde yürütülmüştür. Araştırmada, Çubuk ilçesi belediye mezbahasına yapılan 12 ziyaret sonucu toplanan 230 adet ovaryum kullanılmıştır. Solüsyonlar büyük oranda, Enstitünün Embriyo Transferi laboratuvarında yapılmıştır. Oositlerin maturasyonu amacıyla, 25mM HEPES + NaHCO₃ tamponlu ve %10 FCS+ 2µg/ml FSH katkılı TCM-199 mediumu kullanılmıştır. Fertilizasyon amacıyla BO (Bracket&

Oliphant) mediumu ve aynı gün elde edilerek dondurulan eşit motiliteye sahip boğa spermaları ile direkt sperm yıkama metodu kullanılmıştır. Kültür mediumu olarak CR1aa (aminoasitli Charles Rosencrans) mediumu tercih edilmiştir. Bütün kültür periyotlarında, %5 CO₂, %95'in üzerinde nem içeren 39°C'deki inkubatörden yararlanılmıştır.

Metot

Mezbahadan temin edilen ovaryumlar, 25-30°C deki 100mg/l Kanamisin Sülfat ihtiva eden %0.9'luk serum fizyolojik içerisinde azami üç saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Takagi ve arkadaşlarının (12) tarif ettiği şekilde ovaryumlardan aspirasyon ve dilimleme yoluyla oositler elde edilmiştir. Laboratuvarında, 5 ml'lik enjektöre takılmış 21 Gauge'lik iğne yardımıyla ovaryum yüzeyindeki 2-8 mm çapındaki foliküllerden oositler aspire edilmiş, ardından steril bistüri yardımıyla ovaryum yüzeyi dilimlenerek %5

buzığı serumu katkılı PBS (fosfat tamponlu solüsyon) yardımıyla ovaryum kesitleri yikanarak oositler elde edilmiştir. Toplanan oositler aynı solüsyon içerisinde değerlendirilerek A ve B sınıfına girenler maturasyon sürecine alınmıştır.

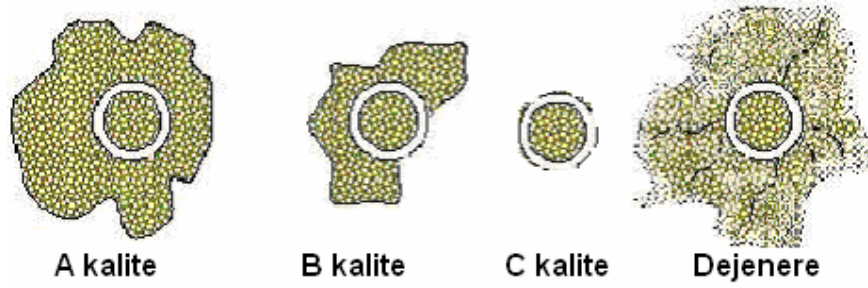
Oosit değerlendirilme kriterleri (Resim 1):

A= Etrafında 5-6 sıradan daha fazla kumulus hücresi bulunan homojen yapı gösteren oositler

B= Etrafında 2-4 sıra kumulus hücresi bulunan veya az bir kısımda kumulus bulunmayan oositler

C= Etrafında kumulus hücresi bulunmayan oositler

D= Etrafındaki kumulus hücre yığını dejenere durumda olan oositler.



Resim 1. Sığır oositlerinin morfolojik kalite sınıflandırması

Oositler 100µl'lik maturasyon mediumu bulunan mikrodamların her birine yaklaşık 20 oosit düşecek şekilde yerleştirilerek 20-22 saat inkube edilmiştir.

İn vitro fertilizasyon amacıyla Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Suni Tohumlama Laboratuvarında üretilen ve içerisinde 175×10^5 spermatozoa bulunan 0.25ml'lik ticari payetlerde dondurulmuş Siyah Alaca ırkı boğa spermaları kullanılmıştır. İn vitro fertilizasyonda farklılığa meydan vermemek amacıyla, bir boğadan aynı gün alınarak dondurulan, eşdeğer motiliteye sahip spermalar kullanılmıştır. Kanagawa ve arkadaşlarının (8) tarif ettiği gibi spermatozoonların kriyoprotektanlar ve seminal plazmadan ayrıştırılması, sulandırılması ve kapasitasyonu amacıyla modifiye BO mediumlarından yararlanılmıştır.

Kullanılan sperm işleme metodunda ölü/canlı spermatozoonların ayırımına ihtiyaç duyulmamış ve işlemler sonunda ortalama %50 motil spermatozoon olmak kaydıyla oosit başına yaklaşık 15000 canlı spermatozoa ile fertilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fertilizasyon amacıyla kullanılan spermatozoonların son yoğunluğu 6.25×10^6 olacak şekilde hazırlanmış olup içerisinde bulunduğu mediumun 95µl'si ile fertilizasyon mikrodamları hazırlanmış ve üzerine mineral yağ ilave edilmiştir. Fertilizasyon mikrodamlarına olgunlaştırılmış oositlerden yaklaşık 20 adet ilave edilerek toplam 100µl'lik inseminasyon şartları sağlanmış ve inkubasyon ortamında 5-6 saat bekle-

tilmiştir. Spermatozoa kapasitasyonu amacıyla 5IU/ml heparin (H3149, Sigma-Aldrich Co.) ve 2mM Kafein (C4144, Sigma-Aldrich Co.) kullanılmış, fertilizasyon işlemlerinin devamı süresince kapasitasyon amacıyla başka bir işleme ihtiyaç duyulmamıştır. İnkubasyon periyodunun ardından oositler CR1aa mediumuna alınarak kumulus hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla pipetleme işlemi yapılmış, ardından da 100µl'lik kültür mediumu (CR1aa) bulunan mikrodamlarda inkubasyona bırakılmış ve 48 saat sonra ilk bölünme kontrolü yapılmıştır. Kültür periyodu içerisinde medium değişimi yapılmamıştır.

Kaliteli embriyolar ikişer adet olmak üzere 5 (beş) baş taşıyıcıya ipsilateral olarak transfer edilmiştir. Transferleri izleyen 50. günde ultrasonla gebelik kontrolleri yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışmada, 12 mezbaha ziyareti gerçekleştirilerek, 230 ovaryum toplanmış ve bu ovaryumlardan 1661 iyi (A ve B) kalite, 498 C kalite ve dejenere olmak üzere toplam 2159 oosit elde edilmiştir. İyi kalite olanlardan 1330'u in vitro embriyo üretimi için, kullanılmıştır. Çalışmada, birim ovaryum başına elde edilen A ve B kalite oosit sayısı 7.22, C kalite ve dejenere oosit sayısı 2.16 olmak üzere toplam 9.38 olmuştur. Elde edilen oositlerin morfolojik değerlendirmelerinde, A kalite olanların 4 veya daha fazla sayıda kumulus hücre sırasına sahip oldukları, kumulus hücrelerinin kompakt yapıda ve oositi sıkıca

çevreledikleri, oositlerin de homojen yapıda bir ooplazmaya sahip oldukları; B kalite oositlerin, birkaç kumulus hücre sırasıyla ve A kalite oositlere göre daha gevşek bir şekilde sarılı oldukları, bazı bölgelerinde kumulus hücrelerinin bulunmadığı, ooplazmalarının koyu granüller içerdiği gözlenmiştir. Mikroskopik incelemede C kalite oositlerin kumulus hücrelerine sahip olmadıkları, dejenere oositlerin oldukça koyu görünümde oldukları, kumulus hücrelerinin yapılarının bozulduğu ve fibrin-

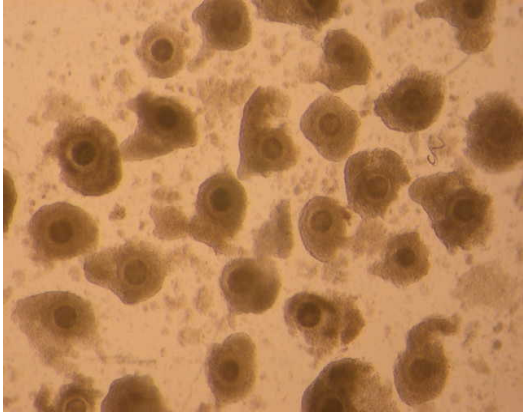
li bir tarzda oldukları gözlenmiştir (Resim 2, 3, 4).

İn vitro Maturasyon Bulguları

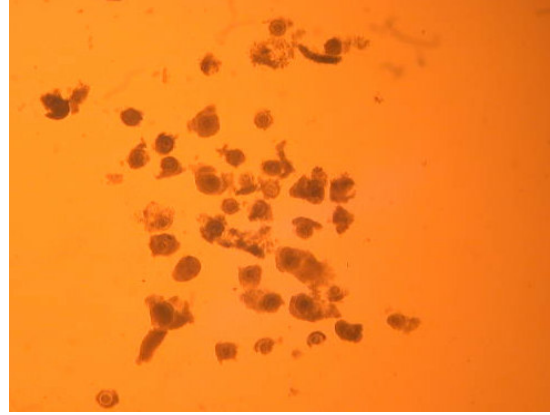
İn vitro maturasyon periyodu sonunda, kumulus ekspansiyonu görülen oositlerin mature oldukları kabul edilmiştir (Resim 5). Buna göre, % 92.0 maturasyon ve % 2.2 dejenerasyon bulgusu elde edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Maturasyon ve dejenerasyon sonuçları

PARAMETRE	
Maturasyona alınan oosit sayısı	1330
Mature olan oosit sayısı	1224
Maturasyon oranı (%)	92.0
Dejenere olan oosit sayısı	27
Dejenerasyon oranı (%)	2.2



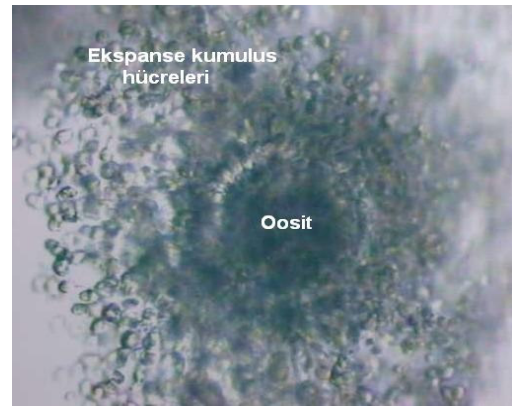
Resim 2. A kalite oositler



Resim 3. B kalite oositler



Resim 4. C kalite oositler



Resim 5. Kumulus ekspansiyonu

Bölünme ve Partenogenez Bulguları

Mature olan toplam 948 oosit fertilizasyon için 267'si ise partenogenetik bölünme tespiti amacıyla kullanılmıştır. İn vitro fertilizasyon tespiti için 48. saatte yapılan mikroskopik incelemelerde, iki ya da daha çok sayıda bölünen 683 oositin fertilize olduğu kabul edil-

miştir (Resim 6, 7). Mature oositlerinden rastgele alınan 267 oosit ve ölü spermatozoonların kullanıldığı fertilizasyon işlemi 48. saatte 12 adet bölünme gözlenmiş, dolayısıyla % 4.5 oranında partenogenetik bölünme olduğu belirlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Bölünme, partenogenetik bölünme ve morula-blastosiste gelme sonuçları

PARAMETRE	Bölünme
Fertilizasyona alınan oosit sayısı	948
Bölünen zigot sayısı	683
Bölünme oranı (%)	72.0
Partenogeneze alınan oosit sayısı	267
Partenogenetik olarak bölünen oosit (n)	12
Partenogenetik bölünme oranı (%)	4.5
Embriyo kültürüne alınan zigot sayısı	652
Morula -Blastosiste ulaşan embriyo sayısı	222
Morula-Blastosiste ulaşan embriyo (%)	34.0



Resim 6. Bölünmüş zigot



Resim 7. Dört hücreli bir embriyo

Morula-Blastosist Olma Bulguları

Fertilize oositlerin embriyo kültür sürecine alınmalarını takip eden 7. günde yapılan mikroskop incelemesinde, morulablastosist aşamasına gelen embriyolar kaydedilmiştir (Resim 8). Çalışma gruplarında, ortalama %34.0 morulablastosiste ulaşma oranı elde edilmiştir (Tablo 2). Elde edilen Kompakt

morula veya Blastosist aşamasındaki iyi kalite in vitro üretilmiş embriyolardan, her payette ikişer adet embriyo bulunmak üzere farklı zamanlarda beş adet taze transfer yapılmıştır. Transferleri takip eden 50. günde yapılan ultrason muayenelerinde iki gebelik tespit edilmiş ve bir sağlıklı buzağı doğmuştur (Resim 9).

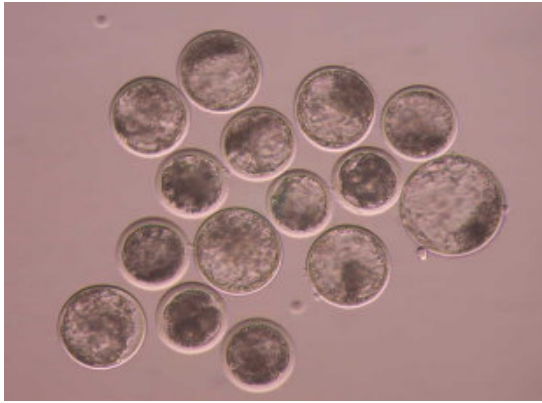
TARTIŞMA ve SONUÇ

Sığır oositlerinin maturasyon ve fertilizasyon çalışmalarında, oositlerin maturasyon ve fertilizasyon oranlarını artırmak amacıyla temel maturasyon ortamlarına çok sayıda katkı maddesi ilave edilmektedir. FCS oosit gelişimine olumlu etkilerinden dolayı bu katkı maddeleri içerisinde önemli bir yer tutmaktadır (4, 18).

Gordon (7), foliküler aspirasyon ve ovaryum dilimlemesi tekniği birlikte kullanıldığında ovaryum başına 9.2-20.3 arasında iyi kalite oosit elde edilebildiğini bildirmiştir. Takagi ve arkadaşlarının da (12) bu iki yöntemin birlikte etkin olduğuna dair bildirim-

leri mevcuttur. Sunulan çalışmada, aspirasyon ve ovaryum dilimlemesi tekniklerinin kullanılmasıyla ovaryum başına 7.22 iyi kalite (A+B kalite) oosit elde edilmiştir. Çalışmada ovaryum kaynağı olarak kullanılan hayvanların kondüsyonlarının zayıf olduğu göz önüne alındığında erişilen oosit toplama sayısının kabul edilebilir olduğu ve tatmin edici düzeyde in vitro embriyo üretimi sağladığı görülmektedir.

Wiemer ve ark. (17), %10 oranında FCS ve hormon katkılı maturasyon ortamı ile % 91.3 maturasyon oranına ulaşmışlardır. Benzer bir çalışmada Fukui ve Ono (6), FCS katılan



Resim 8. Kompakt morula ve Blastosist aşamasında embriyolar



Resim 9. İn vitro koşullarda üretilen embriyolardan doğan buzağı ve taşıyıcı annesi

grupta % 52.7 oranında maturasyon oranı elde etmişlerdir. Sunulan bu çalışmada elde edilen maturasyon sonuçları, Wiemer ve ark. (17)'nin bulgularıyla uyumlu; Fukui ve Ono'nun (6) bulgularından ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu farklılıkların, çalışmalarda kullanılan farklı kültür ortamları ve medium bileşimleriyle ya da kullanılan kültür vasatlarının ürün (Lot) numarasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Dong ve ark. (5), maturasyonun safhalarını ayrıntılı olarak inceledikleri çalışmalara

rında; % 2 ile % 4 arasında dejenerasyon oranı saptamışlardır. Ocana ve ark. (11), maturasyon ortamına % 20 oranında FCS ilave ettikleri gruplarda % 2 dejenerasyon oranı elde etmişlerdir. Ün ve Küplülü (16), folikül büyüklüğüne göre sınıflandırdıkları gruplarda anormal maturasyon ve dejenerasyon oranlarını birlikte değerlendirmişler ve sırasıyla % 8 ve % 5.1 oranlarında dejenerasyon oranı saptamışlardır. Sunulan bu çalışmada ulaşılan dejenerasyon sonuçları, Dong ve ark. (5) ve Ocana ve ark. (11) ile uyumlu olduğu görülmüş; ancak, Ün

ve Küplülü'nün (16) sonuçlarına kıyasla düşük bulunmuştur. Dejenerasyon oranları in vitro maturasyon sürecine alınan oositlerin kaliteleri ve maturasyon ortamlarına yapılan katkılarla doğrudan ilgili olduğundan gelişim için uygun olmayan oositlerin bu sürece dahil edilmesi, hormon ya da antioksidanlarla in vitro oosit maturasyonunun desteklenmemesi durumlarında dejenerasyon oranının yüksek çıkacağı düşünülmektedir.

Ayoub ve Hunter (1), partenogenetik bölünmelerin in vitro olarak üretilen embriyolardan elde edilen gebelik oranlarının düşük olmasının bir nedeni olabileceğini ifade etmektedirler. Partenogenetik bölünmelerin, maturasyon şartlarından etkilenmediğini, bununla birlikte fertilizasyon ve embriyo kültür şartlarından etkilendiğini kaydetmişlerdir. Anılan araştırmacılar, partenogenetik bölünme oranlarının tespit edilmesi amacıyla yaptıkları bu çalışmada (1), % 3.9 ile % 40.7 arasında partenogenetik bölünme saptamışlardır. Araştırmacılar, maturasyon vasatı olarak TCM-199'un kullanıldığı gruplarda diğer gruplara göre en düşük partenogenetik bölünme oranlarına ulaşmışlardır. Sunulan bu çalışmada, ortalama % 4.5 oranında partenogenetik bölünme oranı elde edilmiş olup bu oran, Ayoub ve Hunter (1)'in bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Wiemer ve arkadaşlarının (17) % 39.4 morula-blastosiste ulaşma oranı elde ettikleri çalışmalarında, in vitro kültür sistemlerinin başarısının büyük oranda oosit seçim kriterleri ve maturasyon şartlarıyla ilgili olduğunu, iyi kalite oositlerin ve maturasyon ortamında hormon katkılarının kullanılmasının embriyo kültürüne olumlu etki yaptığını kaydetmişlerdir. İn vitro maturasyon ortamlarına katılan % 20 FCS'nin embriyo gelişimine etkisinin incelendiği bir çalışmada (6), % 7.7 blastosist elde edilmiştir. Maturasyon ortamında % 10 FCS'nin kullanıldığı bir çalışmada, % 13.0

blastosist elde edilmiştir (9). Benzer bir çalışmada % 10 oranında FCS kullanan Takahashi ve ark. (13), % 22.4 oranında blastosist elde etmişlerdir.

Sunulan çalışmada, blastosiste ulaşma oranı, Wiemer ve ark. (17)'nin bulgularından düşük ancak Fukui ve Ono (6), Kato ve Iritani (9)'nin bulgularından yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmada morula-blastosist oranlarının, Wiemer ve ark. (17)'in sonuçlarından düşük gerçekleşmesinin; seçilen kültür ortamları ve farklı kültür ortamı bileşimlerinden ileri geldiği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, mezbahadan alınan ovaryumlardan toplanan oositler kullanılarak in vitro koşullarda embriyolar üretilebildiği ve bu embriyolardan sağlıklı yavru alınabildiği görülmüştür.

KAYNAKLAR

- 1. Ayoub M A, Hunter A G (1993)** *Parthenogenetic activation of in vitro matured bovine oocytes*. J. Dairy Sci. 76: 421-429.
- 2. Betteridge K J (2004)** *New Reproductive Technologies in Cattle: A Veterinary Perspective*. 23rd World Buiatrics Congress, Quebec-Canada.
- 3. Birler S, Pabuççuoğlu S, Atalla H, Alkan S, Özdaş Ö B, Bacınoğlu S, Cirit Ü, Zavar İ (2002)** *İn vitro üretilen koyun embriyolarının transferi*. Tr. J. Vet. Anim. Sci., 26: 1421-1426.
- 4. Cooke P S, Buchanan D L, Lubahn D B, Cunha G R (1998)** *Mechanism of estrogen action: Lessons from the estrogen receptor-knockout mouse*. Biology of Reprod., 59: 470-475.
- 5. Dong Y J, Varisanga M D, Mtango N R, Aono M, Otoi T, Suzuki T (2001)** *Improvement of the culture conditions for in vitro production of cattle embryos in a portable CO₂ incubator*. Reprod. Dom. Anim., 36: 313-318.
- 6. Fukui Y, Ono H (1989)** *Effects of sera, hormones and granulose cells added to culture medium for in vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes*. J. Rerod. Fert., 86: 501-506.
- 7. Gordon I (1994)** *Laboratory production of cattle embryos*. CAB International Ltd. Co., Philadelphia USA.

- 8. Kanagawa H, Shimohira I ve Saitoh N (1995)** *Manual of Bovine Embryo Transfer* National Livestock Breeding Center MAFF, JICA, Japan.
- 9. Kato H, Iritani A (1993)** *In vitro fertilization in cattle*. *Molecular Reprod. Develop.* 36: 229-231.
- 10. Mapletoft R J, Hasler J F (2005)** *Assisted Reproductive Technologies in Cattle: A Review*, *Rev. Sci. Tech. Int. Epiz.*, 24:1, 393-403.
- 11. Ocana J M Q, Pinedo M M, Moreno M M (1999)** *The effect of different sera and bovine serum albumen fraction (BSA) on in vitro maturation of immature bovine oocytes*. *Arc. Zootec.*, 48: 167-174.
- 12. Takagi Y, Mori K, Takahashi T, Sugawara S, Masaki J (1992)** *Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing*. *J. Anim Sci.* 70: 1923-1927.
- 13. Takahashi Y, Hishinuma M, Matsui M, Tanaka H, Kanagawa H (1996)** *Development of in vitro matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: Influence of oxygen concentration in the gas atmosphere*. *J. Vet. Med. Sci.*, 58 (9): 897-902.
- 14. Taneja M, Yang X J (1998)** *Promises and problems of in vitro production of embryos by TVOR-IVF scheme in cows and heifers*. *International Embryo Transfer Society. Embryo Transfer Newsletter*, 16(4): 14-19.
- 15. Tekeli T (1984)** *Investigations on in vitro fertilization of rabbit ova*. *A.Ü. Vet. Fak. Derg.*, 31(2): 186-196.
- 16. Ün M, Küplülü Ş (2003)** *The effects of follicle diameter on the in vitro fertilization capacity of bovine oocytes aspirated from the sloughered ovaries*. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* 50: 203-207.
- 17. Wiemer K E, Watson A J, Polanski V, McKenna A I, Fick G H, Schultz G A (1991)** *Effects of maturation and co-culture treatments on the developmental capacity of early bovine embryos*. *Molecular Reprod. Develop.*, 30: 330-338.
- 18. Younis A I, Bracket B G, Fayrer-Hosken R A (1989)** *Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro*. *Gamete Research*, 23: 189-201.