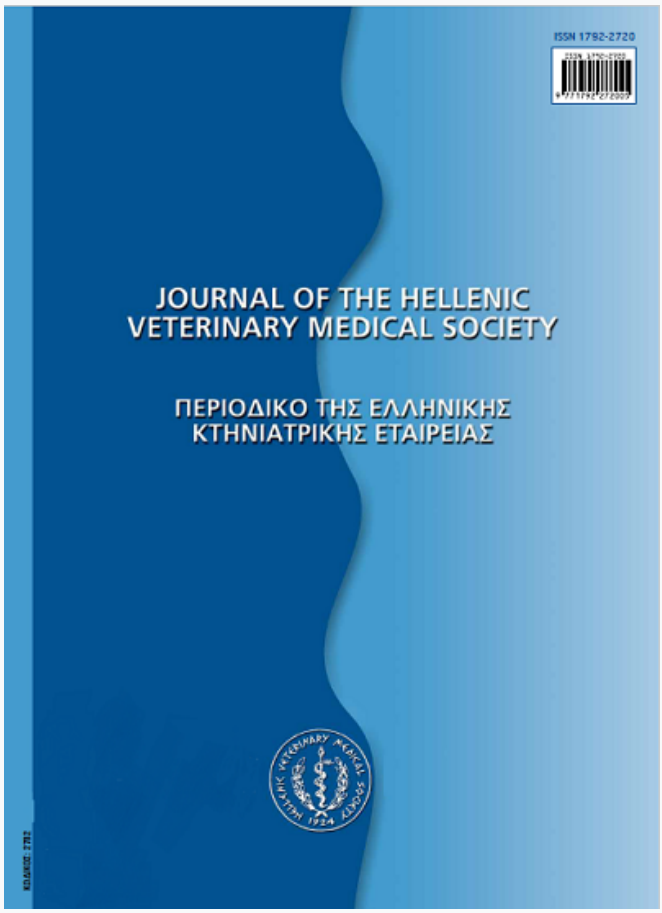
ePublishing

Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

Vol 53, No 3 (2002)



The use of multiple ovulation, embryo cryopreservation and embryo transfer techniques to facilitate movement of genetic material between countries

K. STAMATARIS (Κ. ΣΤΑΜΑΤΑΡΗΣ), K. DELIGIANNIS (Κ. ΔΕΛΗΓΙΑΝΝΗΣ), T. LAINAS (Θ. ΛΑΪΝΑΣ), G. ARSENOS (Γ. ΑΡΣΕΝΟΣ)

doi: 10.12681/jhvms.15378

Copyright © 2018, K STAMATARIS, K DELIGIANNIS, T LAINAS, G ARSENOS

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.

To cite this article:

STAMATARIS (Κ. ΣΤΑΜΑΤΑΡΗΣ) K., DELIGIANNIS (Κ. ΔΕΛΗΓΙΑΝΝΗΣ) K., LAINAS (Θ. ΛΑΪΝΑΣ) T., & ARSENOS (Γ. ΑΡΣΕΝΟΣ) G. (2018). The use of multiple ovulation, embryo cryopreservation and embryo transfer techniques to facilitate movement of genetic material between countries. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, *53*(3), 237–246. https://doi.org/10.12681/jhvms.15378

https://epublishing.ekt.gr | **e-Publisher:** EKT | **Downloaded at:** 26/03/2026 15:44:36

ΠΕΡΙΟΔΙΚΟ ΤΗΣ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗΣ ΕΤΑΙΡΕΙΑΣ 2002, 53(3): 237-246
JOURNAL OF THE HELLENIC VETERINARY MEDICAL SOCIETY 2002, 53(3): 237-246

Ερευνητική
Original article

Χρήση των τεχνικών πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, κατάψυξης και μεταφοράς εμβρύων για τη διακίνηση γενετικού υλικού μεταξύ χωρών

Κ. Σταματάρης[1], Κ. Δεληγιάννης[2], Θ. Λαΐνας[3], Γ. Αρσένος[1]

ΠΕΡΙΛΗΨΗ. Αντικείμενο της εργασίας ήταν η αξιολόγηση των τεχνικών πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, κατάψυξης και μεταφοράς εμβρύων από μια εγχώρια γαλακτοπαραγωγό φυλή προβάτων. Χρησιμοποιήθηκαν 50 προβατίνες Καραγκούνικης φυλής. Ο συγχρονισμός του οίστρου έγινε με τη χρήση ενδοκολπικών σπόγγων εμποτισμένων με προγεσταγόνα, ενώ για την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας χρησιμοποιήθηκε ομόλογος ωοθυλακιοτρόπος ορμόνη (oFSH). Έξι ημέρες μετά τη λαπαροσκοπική σπερματέγχυση με νωπό σπέρμα, έγινε συλλογή εμβρύων χειρουργικά, και αφού εκτιμήθηκε η ποιότητά τους, καταψύχθηκαν. Οι προβατίνες που χρησιμοποιήθηκαν ως δότριες είχαν ένα μέσο δείκτη ωοθυλακιορρηξίας 11,9 (s.e. 0,89). Το ποσοστό των ωαρίων που συλλέχτηκαν ήταν 80,9% και η γονιμότητα τους έφτασε το 87,6%. Περίπου 327 (77,5%) από τα βιώσιμα έμβρυα κρίθηκαν κατάλληλα για κατάψυξη. Τα στάδια ανάπτυξης των εμβρύων, που συλλέχτηκαν, ήταν από του όψιμου μοριδίου έως της πλήρους βλαστοκύστης και η κατάψυξή τους έγινε σε τρία επίπεδα σε 1.5M αιθυλική γλυκόλη, μετά από επανειλημμένα πλυσίματα και επεξεργασία με θρυψίνη. Μετά την κατάψυξή τους τα έμβρυα μεταφέρθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο (Σκωτία). Το Δεκέμβριο του ιδίου έτους, τα έμβρυα αποψύχτηκαν γρήγορα και επανενυδατώθηκαν σε δύο στάδια με βαθμιαία προσθήκη σουκρόζης/αιθυλικής γλυκόλης. 92,4% των κατεψυγμένων εμβρύων παρέμειναν κατάλληλα και μεταφέρθηκαν, χειρουργικά, σε προβατίνες δέκτες της φυλής Scottish Blackface που είχαν υποστεί συγχρονισμό οίστρου. Συνολικά μεταφέρθηκαν 183 έμβρυα με βιωσιμότητα 66,1%. Η βιωσιμότητα των κατεψυγμένων βλαστοκύστεων (75%) που αποψύχτηκαν ήταν σημαντικά υψηλότερη ($P<0.01$) από εκείνη των μοριδίων (48%). Συμπεραίνεται, ότι τα κατεψυγμένα έμβρυα μπορούν να αποτελέσουν ένα επιτυχές μέσο για τη μεταφορά πρόβειου γενετικού υλικού από και προς την Ελλάδα. Πρέπει, όμως, κατά την επιλογή των εμβρύων να δίνεται ιδιαίτερη σημασία στο στάδιο ανάπτυξής τους, αφού φαίνεται ότι αποτελεί παράγοντα αποφασιστικής σημασίας για την επιτυχία της μεθόδου.

Λέξεις ευρετηρίασης: πρόβατο, Καραγκούνικη φυλή, κατάψυξη εμβρύου, μεταφορά εμβρύου

[1] Τομέας Ζωικής Παραγωγής, Ιχθυολογίας, Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος, Τμήμα Κτηνιατρικής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τ.Θ. 393, 541 24 Θεσσαλονίκη
[2] Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας, Καρδίτσα.
[3] Διεύθυνση Κτηνιατρικής Καρδίτσας, Καρδίτσα.

Ημερομηνία υποβολής: 18.02.2002
Ημερομηνία εγκρίσεως: 01.07.2002

The use of multiple ovulation, embryo cryopreservation and embryo transfer techniques to facilitate movement of genetic material between countries

Stamataris K.[1], Deligiannis K.[2], Lainas T.[3], Arsenos G.[1]

ABSTRACT. The objective of the study was to evaluate the use multiple ovulation and embryo transfer techniques in an indigenous Greek dairy breed of sheep. We stimulated selected donor ewes of the Karagouniko breed to produce large numbers of embryos after the induction of multiple ovulations by gonadotropin treatment (superovulatory response). A total of 50 Greek Karagouniko ewes were synchronised into oestrus using progestagen pessaries and superovulated for embryo transfer using ovine FSH. Six days following laparoscopic insemination with fresh semen ewes were flushed surgically and embryos collected. Subsequently, the embryo recovery, along with embryo cryopreservation, embryo survival and quality were assessed. The Karagouniko donor ewes achieved a mean ovulation rate of 11.9 (SE. 0.89). The ova Recovery rate was 80,9% and 87,6% of the ova recovered being fertilised. A total of 327 (77,5%) of the viable embryos were assessed as being of sufficient quality for cryopreservation. The embryos ranged from late morulae to expanded blastocyst and were frozen via a 3-step process in 1.5 M ethylene glycol following repeated washing and trypsination. Cryopreserved embryos were frozen and then transported to Scotland, UK. There, embryos were thawed rapidly and re-hydrated via a 2 step sucrose/ethylene glycol gradient. A total of 92.4% of embryos frozen remained suitable for transfer semi-surgically into synchronised Scottish Blackface ewes. 183 embryos were transferred in total with a 66.1% survival rate. The survival rate of frozen thawed blastocysts (75%) was significantly greater than ($P<0.01$) that for morulae (48%). It was concluded that MOET could be successfully applied in Greek dairy breeds of sheep as a means for genetic improvement. Frozen embryos could be a successful medium for the transportation of ovine genetic material from and to Greece, however, most likely the choice of embryonic stage for cryopreservation is crucial.

Keywords: sheep, MOET, superovulation, embryo freezing, embryo transfer.

[1] Department of Animal Production, Ichthyology, Ecology and Environmental Protection, School of Veterinary Medicine, Aristotle University of Thessaloniki, 54124 Thessaloniki, Greece
[2] National Agricultural Research Foundation of Greece, Karditsa, Greece.
[3] State Veterinary Services of Karditsa, Ministry of Agriculture, Greece.

Submission date: 18.02.2002
Approval date: 01.07.2002

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η τεχνική της πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας και της μεταφοράς εμβρύων (ΠΩΜΕ) στα πρόβατα είναι γνωστή από τις αρχές του περασμένου αιώνα (Ishwar and Memon 1996). Θεωρητικά, η τεχνική είναι μάλλον απλή και περιλαμβάνει την πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας ατομικά σε κάθε προβατίνα (προβατίνα-δότης), την εφαρμογή τεχνητής σπερματέγχυσης και, τέλος, τη συλλογή των εμβρύων τα οποία, μετά από έλεγχο της καταλληλότητάς τους και αξιολόγηση, μεταφέρονται σε προβατίνες δέκτες. Τα έμβρυα μπορούν να μεταφερθούν αμέσως σε προβατίνες-δέκτες που έχουν κατάλληλα προετοιμαστεί ή καταψύχονται για να χρησιμοποιηθούν μελλοντικά (Ishwar and Memon 1996). Παρά τη θεωρητική απλότητα της τεχνικής ΠΩΜΕ η ευρεία χρήση της στην προβατοτροφία άρχισε σταδιακά στο τέλος της δεκαετίας του '80 (Ishwar and Memon 1996, Naqvi και συν. 2001). Η εφαρμογή της τεχνικής αποτελεί ένα μέσο γενετικής βελτίωσης στοχεύοντας συγκεκριμένα στην εκμετάλλευση θηλυκών ατόμων υψηλής γενετικής αξίας, ώστε να δώσουν μεγαλύτερο αριθμό απογόνων από εκείνον που θα μπορούσαν κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (Ishwar and Memon 1996, Loi και συν. 1999, Cognie 1999, Bari και συν. 2000). Ο McKelvey (1999) υποστήριξε ότι η εφαρμογή της τεχνικής MOET μπορεί να οδηγήσει σε διπλασιασμό του ρυθμού γενετικής βελτίωσης σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό ζώων μέσω της αύξησης της επιλογής των επιθυμητών χαρακτηριστικών και της μείωσης του μεσοδιαστήματος μεταξύ διαδοχικών γενεών. Επιπλέον, η εφαρμογή της τεχνικής ΠΩΜΕ μπορεί να αποτελέσει την οικονομικότερη λύση στη μεταφορά και ανταλλαγή γενετικού υλικού σε διεθνές επίπεδο (Cognie 1999, McKelvey 1999). Αποτελεί κοινή πεποίθηση ότι η εφαρμογή της τεχνικής ΠΩΜΕ μπορεί να αποτελέσει την καλύτερη λύση για τον έλεγχο της μετάδοσης νοσημάτων από την εισαγωγή ζώων σε μια χώρα και κατά συνέπεια να διασφαλίζεται έτσι η υγιεινή κατάσταση των εκτρεφόμενων ζώων σε εθνικό επίπεδο (Singh 1988, Foote και συν. 1993, Singh και συν. 1997, Parker και συν. 1998, Thibier and Guerin 2000). Επιπλέον, ένα ακόμα πλεονέκτημα από την εφαρμογή της τεχνικής ΠΩΜΕ είναι ότι προσφέρεται η δυνατότητα προσαρμογής του γενετικού υλικού, που μεταφέρεται στις προβατίνες-δέκτες, στις νέες συνθήκες. Το γεγονός αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία, όταν η γενετική βελτίωση των εγχώριων φυλών προβάτων στοχεύει στη δημιουργία ατόμων ανθεκτικών σε συγκεκριμένες αρρώστιες (Saberivand and Outteridge 1996).

Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση της τεχνικής ΠΩΜΕ, όπως συνοπτικά περιγράφηκαν παραπάνω, έγιναν περισσότερο εμφανή από την εφαρμογή της σε γαλακτοπαραγωγές αγελάδες όπου είχε σημαντική επιτυχία (Wilmut και συν. 1992, Lohuis 1995, Callesen 1996). Ωστόσο, η εφαρμογή της στα μικρά μηρυκαστικά έγινε με πολύ αργούς ρυθμούς και σε μικρότερη κλίμακα, κυρίως λόγω της μικρότερης οικονομικής τους αξίας αλλά και των προβλημάτων που ανακύπτουν από την ανατομία του γενετικού

INTRODUCTION

The technique of multiple ovulation and embryo transfer (MOET) in sheep has existed from the begging of the last century (Ishwar and Memon 1996). The procedure is rather simple involving super-ovulation of an individual ewe (the 'donor'), inseminating her, and collecting the resulting embryos that are then transferred into recipient or surrogate ewes. The embryos can be transferred 'fresh' or can be frozen for transfer at a later date (Ishwar and Memon 1996). However, commercial application to the sheep industry did not occur until late 80's (Ishwar and Memon 1996, Naqvi et al 2001). In principal, MOET is a tool for genetic improvement aiming to identify genetically superior female animals and enabling them to have more offspring than would be possible naturally (Ishwar and Memon 1996, Loi et al 1999, Cognie 1999, Bari et al 2000). McKelvey (1999) stated that MOET has the potential to double the rate of genetic improvement in a given population through increasing selection intensities and decreasing generation intervals. Moreover, MOET can also be used as the main component to a low cost route of exporting genetic material across international boundaries (Cognie 1999, McKelvey 1999). The latter is widely acknowledged as the best available option to control disease transmission during imports of genetic material into a particular country and hence to ensure the health status of the national stock (Singh 1988, Foote et al 1993, Singh et al 1997, Parker et al 1998, Thibier and Guerin 2000). MOET has the added advantage of allowing imported stocks to develop in recipients well adapted to local conditions and can be used as a means for disease resistance in the breeding objectives and breeding strategies in either indigenous or other susceptible sheep (Saberivand and Outteridge 1996).

An appreciation of the potential benefit of MOET, briefly reviewed above, was perhaps best demonstrated in dairy cows where it has been applied with considerable success (Wilmut et al 1992, Lohuis 1995, Callesen 1996). However, the application of MOET techniques to small ruminants has been much more slower mainly due to the lower economic value of these animals but also due to difficulties as a result of the reproductive anatomy of such animals (Armstrong and Evans G 1983, McKelvey et al 1985, McKelvey 1986, Ishwar and Memon 1996, Loi et al 1999). Overcoming such difficulties is therefore important not only as a method of increasing the number of elite animals in a herd but also from an economical and practical point of view provided that limitations are understood. For example, although, cryopreservation has become an integral part of the commercial embryo transfer industry its application in sheep embryos is based on comparatively few studies (Boundy et al 1985, McKelvey and Simm 1995, Ishwar and Memon 1996) and the process continues to be improved and simplified (McGinnis et al 1993, Naqvi et al 2001). To date the information on the success rate of such cryopreservation techniques is scarce, particularly when applied to the large-scale movement of sheep embryos

συστήματος των θηλυκών ατόμων (Armstrong and Evans G 1983, McKelvey και συν. 1985, McKelvey 1986, Ishwar and Memon 1996, Loi και συν. 1999). Κατά συνέπεια, η αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων έχει ιδιαίτερη σημασία όχι μόνο επειδή δίνει τη δυνατότητα για εκμετάλλευση του γενετικού δυναμικού επιλεγμένων ζώων ενός κοπαδιού, αλλά και από οικονομική άποψη είναι πιο συμφέρουσα από την εισαγωγή ζωντανών ζώων με την προϋπόθεση ότι είναι κατανοητά τα μειονεκτήματά της. Για παράδειγμα, ενώ η κατάψυξη εμβρύων αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα για τη μεταφορά τους, δεν υπάρχουν επαρκείς πληροφορίες σε ό,τι αφορά την αποτελεσματικότητά της στα πρόβατα (Boundy και συν. 1985, McKelvey and Simm 1995, Ishwar and Memon 1996) και υπάρχει συνεχές ενδιαφέρον για τη βελτίωση των εφαρμοζόμενων τεχνικών (McGinnis και συν. 1993, Naqvi και συν. 2001), ιδιαίτερα μέσα στα πλαίσια της διακίνησης εμβρύων μεταξύ χωρών.

Η παρούσα εργασία αποτελεί τμήμα ενός ευρύτερου ερευνητικού προγράμματος, που χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και είχε ως κύριο στόχο την εκτίμηση της ποιότητας και της εμπορικότητας του παραγόμενου πρόβειου κρέατος στις μειονεκτικές περιοχές της Κοινότητας. Ειδικότερα, το αντικείμενο της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να εκτιμηθεί η δυνατότητα χρησιμοποίησης τεχνικών πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας, κατάψυξης και μεταφοράς εμβρύων από προβατίνες της Καραγκούνικης φυλής.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Συγχρονισμός οίστρου και πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας

Πενήντα (50) προβατίνες ηλικίας 4-6 ετών της φυλής Καραγκούνικο χρησιμοποιήθηκαν ως δότριες. Τα ζώα επιλέχτηκαν από το ποίμνιο του Εθνικού Ιδρύματος Αγροτικών Ερευνών της Καρδίτσας στην αρχή της αναπαραγωγικής τους περιόδου (αρχές Ιουνίου). Όλες οι προβατίνες εκτρέφονταν κάτω από ημιεκτατικές συνθήκες και τους χορηγούνταν συμπληρωματικά μίγμα συμπυκνωμένων ζωοτροφών για την κάλυψη των θρεπτικών αναγκών τους (ARC 1990). Το μέσο σωματικό βάρος (Σ.Β.) των προβατινών ήταν 63 χλγ. και ο μέσος δείκτης θρεπτικής κατάστασης ήταν 2,75. Όλες είχαν πραγματοποιήσει τον προηγούμενο τοκετό τους το Δεκέμβριο και η διάρκεια της περιόδου γαλουχίας ήταν 6 εβδομάδες. Οι προβατίνες χωρίστηκαν σε 5 ομάδες των 10 ζώων και στη συνέχεια άρχισε η προετοιμασία τους για τη συλλογή εμβρύων.

Για το συγχρονισμό του οίστρου χρησιμοποιήθηκαν ενδοκολπικοί σπόγγοι εμποτισμένοι με προγεσταγόνα (45 mg cronolone, Chronogest, Intervet Laboratories Ltd), που παρέμειναν ενδοκολπικά για 12 ημέρες. Η πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας έγινε με ενδομυϊκή χορήγηση συνολικά 10 ml ομόλογης ωοθυλακιοτρόπου ορμόνης (oFSH, Ovagen, Immuno-Chemical Products Ltd). Η oFSH χορηγήθηκε σε 8 ισόποσες δόσεις σε 12-ωρα διαστήματα (η συνολική ποσότητα, που χορηγήθηκε αντι-

across international boundaries.

The present work formed part of a wider series of studies, supported by the European commission, designed to assess the quality and marketability of sheep meat produced in the less favoured areas of the Community (LFAs). Our specific objective here was to assess the possibilities of using multiple ovulation and embryo transfer techniques in small-sized breeds of sheep indigenous to LFAs of the Community. The work concentrated particularly on the superovulatory response of donor ewes, embryo recovery, along with embryo cryopreservation, embryo survival and quality.

MATERIAL AND METHODS

Synchronisation and Superovulation of donor ewes

A total of 50 mature (4-6 crop) Karagouniko ewes of the National Institute for Agricultural Research in Karditsa Greece, were prepared as donor ewes at the begging of their breeding season (early June). All donor ewes were kept under semi-extensive husbandry conditions and were fed on a maintenance diet (ARC 1990). The mean live weight and condition score of donor ewes was 63 kg and 2.75, respectively. Their immediate past lambing was December of the preceding year with a weaning period that lasted for 6 weeks. The donor ewes were housed in groups of 10 and were prepared for embryo collection on consecutive days. Donor ewes were synchronised in oestrus using intravaginal progestagen pessaries impregnated with 45 mg of Cronolone (Chronogest: Intervet Laboratories Ltd) inserted on day 0 and then left *in situ* for a period of 12 days. Superovulation was induced by treatment with ovine follicle stimulating hormone, FSH (Ovagen, Immuno-Chemical Products Ltd) that was administered in 8 equal doses at 12-hourly intervals (total dose equivalent to 9 mg NIADDK-oFSH-17) commencing 60 hours prior to the end of progestagen treatment. At the last ovagen injection all sponges were removed. All donors were also given prostaglandin F_{2a} (0.5 ml Estrumate: Coopers Animal Health Ltd) at the time of the first injection of Ovagen.

Semen collection and Artificial Insemination

Fresh semen was collected on insemination days from two 4-year-old Karagouniko rams (average live weight 90 kg). Rams were allowed to mount an ovaroctomised ewe treated with oestradiol benzoate (50 μg). Semen was collected using an artificial vagina and was diluted with phosphate buffered saline (PBS) to give a minimum concentration of $10x10^8$ spermatozoa per ml. Intrauterine insemination was carried out at 48 hours after the end of progestagen treatment, using the laparoscopic method of McKelvey, et al (1985), with a dose of 0.1 ml diluted fresh semen for each uterine horn, containing approximately 10 x 10^7 sperm.

Ova recovery and evaluation

Embryos were recovered by the laparscopic/surgical

στοιχούσε σε 9 mg NIADDK-oFSH-17) ξεκινώντας την πρώτη δόση 60 ώρες πριν από την αφαίρεση των ενδοκολπικών σπόγγων. Σε όλες τις προβατίνες, ταυτόχρονα με την πρώτη δόση ovagen, γινόταν και χορήγηση 0,25 ml προσταγλανδίνης $F_{2\alpha}$ (Estrumate, Coopers Animal Health Ltd). Κατά την τελευταία χορήγηση oFSH γινόταν και αφαίρεση των ενδοκολπικών σπόγγων.

Συλλογή σπέρματος και τεχνητή σπερματέγχυση

Νωπό σπέρμα συλλέχτηκε τις ημέρες της σπερματέγχυσης από δύο κριάρια ηλικίας τεσσάρων ετών (με μέσο Σ.Β. περίπου 90 χλγ.). Στα κριάρια επετράπη να οχεύσουν μια προβατίνα που της είχαν αφαιρεθεί οι ωοθήκες και της είχε χορηγηθεί η απαραίτητη ποσότητα (50 μg) βενζοϊκής οιστραδιόλης. Το σπέρμα συλλέχτηκε με τη χρήση τεχνητού κόλπου και αραιώθηκε με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (Phosphate Buffer Saline, PBS), ώστε να έχει ελάχιστη συγκέντρωση σπερματοζωαρίων $10x10^8$ ανά ml. Πραγματοποιήθηκε ενδομήτρια σπερματέγχυση 48 ώρες μετά την εξαγωγή των σπόγγων με τη μέθοδο λαπαροσκόπησης (McKelvey και συν. 1985), με έγχυση 0,1 ml αραιωμένου νωπού σπέρματος, σε κάθε κέρας της μήτρας, που περιείχε περίπου 10×10^7 σπερματοζωάρια.

Συλλογή εμβρύων και αξιολόγηση

Η συλλογή των εμβρύων έγινε την έκτη ημέρα μετά τη σπερματέγχυση. Τα έμβρυα συλλέχθηκαν σε PBS με έκπλυση των κεράτων της μήτρας σύμφωνα με τη λαπαροσκοπική/χειρουργική μέθοδο των McKelvey και συν. 1985, 1986). Όλα τα βιώσιμα έμβρυα ταξινομήθηκαν με βάση την ποιότητά τους. Τα κριτήρια για την ποιοτική τους κατάταξη ήταν: (i) η κανονικότητα του σχήματος του εμβρύου, (ii) ο χώρος που καταλάμβαναν τα βλαστομερίδια, (iii) οι διαφορές στο κυτταρικό μέγεθος, (iv) χρωματισμός και υφή του κυτταροπλάσματος, και (v) η διάμετρος του εμβρύου. Ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης τα έμβρυα κατατάχθηκαν σε: (1) στάδιο πρώιμου μοριδίου και μοριδίου, (2) στάδιο συμπαγούς μοριδίου, (3) στάδιο πρώιμης βλαστοκύστης και βλαστοκύστης και (4) στάδιο εκτεινόμενης βλαστοκύστης και εκκολαφθείσας βλαστοκύστης. Δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στην αποφυγή συμφύσεων στη μήτρα μετά την επέμβαση. Το εξωτερικό της τοίχωμα πλυνόταν σχολαστικά με ηπαρινισμένο ορό. Στη συνέχεια σε όλες τις προβατίνες – δότριες χορηγήθηκαν ενδομυϊκά 2 ml οξυτετρακυκλίνης μακράς δράσης (Oxyvet 20% LA, Veterin, SA). Οι προβατίνες παρέμειναν κλεισμένες στο προβατοστάσιο για λίγες μέρες μετά την επέμβαση, ώστε να είναι δυνατή η στενή παρακολούθηση της συμπεριφοράς και της υγείας τους πριν αναμιχθούν με το υπόλοιπο ποίμνιο.

Κατάψυξη εμβρύων

Τα έμβρυα μεταφέρθηκαν από το διάλυμα PBS σε νέο υπόστρωμα ηπαρίνης που παρασκευάστηκε με την προσθήκη 1.000.000 μονάδων βενζοϊκής πενικιλλίνης, 1 g θειικής στρεπτομυκίνης και 5.000 μονάδων ηπαρίνης σε 1 λίτρο φυσιολογικού ορού. Ακολούθησε η προετοιμασία για κατάψυξη με την παρακάτω διαδικασία. Κατ' αρχήν με-

procedure described by McKelvey et al (1985 and 1986) on day 6 following insemination. All viable embryos were graded according to quality. The major criteria for evaluation included: (i) regularity of the shape of the embryo, (ii) compactness of the blastomers, (iii) differences in the cell size, (iv) colour and texture of the cytoplasm, and (v) overall diameter of the embryo. According to their stage of development the embryos were evaluated as follows: (1) stage of early morulae and morulae (2) stage of early blastocyst and blastocyst (3) stage of expanding blastocyst and expanding hatched blastocyst. Specific attention was paid to minimise any post-operative adhesions in the uterus; its external wall was carefully washed with heparinised saline. Subsequently all donor ewes were injected with 2 ml of long acting oxytetracycline (Oxyvet 20% LA, Veterin, SA) and were kept indoors over the next few days in order to monitor their health status before being allowed to return to grazing.

Embryo cryopreservation

Embryos were transferred after 5 washes with phosphate buffer saline into a new heparin medium that was prepared by adding one million units of benzyl penicillin sodium, 1 g streptomycin sulphate and 5,000 units of heparin to 1 litre of normal saline. Subsequent freezing was carried out as follows. Firstly they were transferred to 0.5 M ethylene glycol for 10 minutes, followed by 10 minutes in 1.0 M ethylene glycol and finally 20 minutes in 1.5 M ethylene glycol. The embryos were stored in straws and were frozen using a programmable freezer (see Table 1 for detail). Thereafter all straws were plunged into liquid nitrogen (-196°C) where they were kept until their use.

Embryo transplantation

All frozen embryos were transferred in the UK. There, they were thawed and re-hydrated via a 2 step sucrose/ethylene glycol gradient. After thawing, 89% of frozen embryos remained suitable for transfer into recipient ewes. A total of 100 Scottish Blackface ewes were used as recipients. They synchronised in oestrus by the use of intravaginal pessaries impregnated with 30 mg of cronolone (Chronogest, Intervet Laboratories Ltd). The pessaries were inserted on day 0 and then left *in situ* for a period of 12 days. At sponge removal 300 IU PMSG (Intervet Laboratories Ltd) was administered by intramuscular injection. Using the method of McKelvey et al (1985 and 1986), 182 embryos were transferred, generally in pairs, into 82 recipient ewes. Any return to service was recorded using teaser rams, with marking colours. The confirmation of pregnancy to the transferred embryos was done by ultrasound scanning at day 55 after transfer.

STATISTICAL ANALYSIS

All statistical analyses were performed using the GENSTAT 5 (Lawes Agricultural Trust, 1993). Embryo recovery and embryo survival were calculated on an individual ewe basis. Chi-square analyses were used to

ταφέρθηκαν σε διάλυμα 0.5M αιθυλικής γλυκόλης για 10 λεπτά, στη συνέχεια σε διάλυμα 1.0M αιθυλικής γλυκόλης για 10 λεπτά και, τέλος, σε διάλυμα 1.5M αιθυλικής γλυκόλης για 20 λεπτά. Τα έμβρυα αποθηκεύτηκαν σε σωληνίσκους και αφού καταψύχτηκαν βαθμιαία (βλέπε πίνακα 1) σε προγραμματιζόμενο καταψύκτη, βυθίστηκαν σε υγρό άζωτο (-196˚C), όπου και παρέμειναν μέχρι τη χρήση τους σε προβατίνες δέκτες.

Μεταφορά εμβρύων

Όλα τα έμβρυα μετά την κατάψυξή τους μεταφέρθηκαν στο Ηνωμένο Βασίλειο (Σκωτία). Το Δεκέμβριο του ιδίου έτους τα έμβρυα αποψύχτηκαν και ενυδατώθηκαν σε δυο στάδια με βαθμιαία προσθήκη σουκρόζης/αιθυλικής γλυκόλης. Κατά την απόψυξη 89% των κατεψυγμένων εμβρύων παρέμειναν κατάλληλα για μεταφορά σε προβατίνες-δέκτες. Ως δέκτες χρησιμοποιήθηκαν 100 προβατίνες της φυλής Scottish Blackface. Οι προβατίνες αυτές είχαν συγχρονιστεί με χρήση ενδοκολπικών σπόγγων που ήταν εμποτισμένοι με 30 mg cronolone (Chrono-gest, Intervet Laboratories Ltd). Οι σπόγγοι παρέμειναν ενδοκολπικά για 12 ημέρες. Τη στιγμή της αφαίρεσης των σπόγγων σε κάθε προβατίνα έγινε ενδομυική έγχυση 300 I.U. PMSG (Intervet Laboratories Ltd). Συνολικά, 182 έμβρυα μεταφέρθηκαν, κυρίως σε ζευγάρια, σε 82 προβατίνες δέκτες με τη μέθοδο των McKelvey και συν (1985 και 1986). Για τη διαπίστωση πιθανών επιστροφών σε προβατίνες – δέκτες χρησιμοποιήθηκαν κριάρια ανιχνευτές. Η διάγνωση της κυοφορίας έγινε με τη βοήθεια συσκευής υπερήχων την 55η ημέρα μετά τη μεταφορά.

Πίνακας 1. Διαδικασία κατάψυξης εμβρύων

Επίπεδο/ στάδιο	Διαδικασία	Διάρκεια (min)
1	από 16˚C μέχρι -1˚C, - 1˚C/λεπτό	*
2	Ακινητοποίηση για 5 λεπτά για σταθεροποίηση του δοχείου	5
3	- 1˚C/λεπτό μέχρι τους –7˚C	23
4	Ακινητοποίηση για 5 λεπτά	5
5	- 0.3˚C/λεπτό μέχρι τους –30˚C	81
6	- 0.1˚C/λεπτό μέχρι τους -33˚C	30
7	Ακινητοποίηση για 10 λεπτά και στη συνέχεια εμβάπτιση στο υγρό N_2	10

* Εξαρτάται από τη θερμοκρασία εκκίνησης.

Table 1. Procedure for embryo freezing

Ramp / Number	Procedure	Time (min)
1	From 16˚C to -1˚C, -1˚C/min	*
2	Hold for 5 mins to stabilise chamber	5
3	-1˚C/min to –7˚C	23
4	Hold for 5 min to seed	5
5	- 0.3˚C/min to –30˚C	81
6	-0.1˚C/min to -33˚C	30
7	Hold for 10 min and transfer to liquid N_2	10

* Depends on starting temperature

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του GENSTAT 5 (Lawes Agricultural Trust, 1993). Οι υπολογισμοί σε ό,τι αφορά τη συλλογή, την αξιολόγηση την κατάψυξη και τη βιωσιμότητα των εμβρύων έγιναν ξεχωριστά για κάθε προβατίνα. Για τη σύγκριση των ποσοστών που αφορούν στην αντίδραση των προβατινών στην πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας και τη βιωσιμότητα των εμβρύων χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο χ^2. Επίσης, για τη διαπίστωση των διαφορών που αφορούν στην ανταπόκριση της μεταχείρισης των προβατινών-δοτών και στην αύξηση του σωματικού βάρους των γαλουχούμενων αρνιών χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση διακύμανσης (one-way analysis of variance). Οι συγκρίσεις μεταξύ των μέσων όρων έγιναν με το κριτήριο *t-test*.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Αντίδραση των ωοθηκών των προβατινών στην πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας

Η αντίδραση των ωοθηκών των προβατινών, που χρησιμοποιήθηκαν ως δότριες στην πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας κυμάνθηκε από 0 μέχρι 27 και συνολικά έδωσαν 596 ωοθυλακιορρηξίες, με μέσον όρο ανά προβατίνα 11,9 (s.e. 0,87) (πίνακας 1). Τέσσερις (4) από τις προβατίνες δότριες θεωρήθηκαν ότι δεν αντέδρασαν στην

compare incidences of oestrus and embryo recovery rates. Data for responses of recipient ewes and growth rate of newborn lambs were analysed by one-way analysis of variance. Means were compared using a student t-test.

RESULTS

Response to superovaluation treatment

The supervulatory response achieved by the donor ewes ranged from 0 to 27 and totalled 596 giving a mean of 11.9 (SE: 0.87) ovulations. Four (4) donor ewes that did not have responded to the superovualation treatment (< 4 ovulations) were consequently not flushed.

Ova recovery and fertilisation rate

Table 2 shows the superovulatory responses of donor ewes and embryo yield. The mean ova recovery rate was 10.5 (SE 0.84) ova representing 80.9% of ovulations. The fertilisation rate of 87.6% resulted in a mean embryo yield of 9.2 (SE 0.79). In only one donor did fertilisation completely fail and a 100% fertilisation rate was achieved in 74% of donors (34/46).

Embryo grades and cryopersevation

A total of 327 (77.5%) of the viable embryos were

Πίνακας 2. Αντίδραση των προβατινών στην πρόκληση πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας
Table 2. Superovulatory responses of donor ewes and embryo yield

	Αριθμός προβατινών No of donor ewes	Μέσος όρος (±s.e.) Mean (±SE)	Εύρος Range	Σύνολο Total
Ωοθυλακιορρηξίες Ovulations	50	11.9(±0.87)	0-27	596
Ωάρια που συλλέχτηκαν Ova recoved	46	10.5(±0.84)	0-26	482
Ωάρια που γονιμοποιήθηκαν Fertilised ova	46	9.2(±0.79)	0-23	422
Έμβρυα που καταψύχτηκαν Embryos frozen	46	7.1(±0.74)	0-21	327

αγωγή πρόκλησης πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας (< 4 ωοθυλακιορρηξίες) και δεν χρησιμοποιήθηκαν για τεχνητή σπερματέγχυση.

Συλλογή ωαρίων και ποσοστό γονιμοποίησης

Η μέση τιμή του αριθμού των ωαρίων που συλλέχτηκαν ανά προβατίνα ήταν 10,5 (s.e. 0,84) που αντιπροσωπεύει το 80,9% των ωοθυλακιορρηξιών (πίνακας 2). Το ποσοστό γονιμομοποίησης 87,6% είχε ως αποτέλεσμα μια μέση απόδοση σε έμβρυα 9,2 (s.e. 0,79) (πίνακας 2). Μόνο μια προβατίνα δότης δεν γονιμοποιήθηκε, και στο 74% των προβατινών (34/46) το ποσοστό γονιμοποίησης έφτασε το 100%.

Κατάψυξη των εμβρύων

Από το σύνολο των εμβρύων που συλλέχτηκαν, 327 (77,5%) θεωρήθηκαν κατάλληλα (στάδιο 1 ή 2) για κατάψυξη. Η ανάπτυξη των εμβρύων κυμαινόταν από το στάδιο του όψιμου μοριδίου μέχρι εκείνο της πλήρους βλαστοκύστης. Από τα 95 έμβρυα, που δεν καταψύχθηκαν, τα 17 βρίσκονταν σε πολύ προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης και κατά συνέπεια κρίθηκαν ακατάλληλα για κατάψυξη. τα υπόλοιπα (78) ήταν εκφυλισμένα ή κακής ποιότητας.

Απόψυξη εμβρύων και βιωσιμότητα

Στον πίνακα 3 δίνεται ο αριθμός των εμβρύων που επιβίωσαν σε σχέση με τον αριθμό εμβρύων που μεταφέρθηκαν. Από τα 198 συνολικά έμβρυα που αποψύχθηκαν, 15 έμβρυα (7,6%) δεν επιβίωσαν της διαδικασίας κατάψυξης. Από τα υπόλοιπα (183), που είχαν θεωρηθεί κατάλληλα για μεταφορά, εκτιμήθηκε ότι η ποιότητα 20 εμβρύων (10,9%) υποβαθμίστηκε σε στάδιο κατώτερο του 2. Την 55η ημέρα μετά τη μεταφορά διαπιστώθηκε με υπερηχογράφο ότι κυοφορούσαν 69 προβατίνες-δέκτες από ένα σύνολο 82 προβατινών που είχαν δεχθεί έμβρυα. Πριν από τον τοκετό δύο (2) προβατίνες απέβαλαν και μια, που κυοφορούσε δίδυμα έμβρυα πέθανε. Οι υπόλοιπες 66 προβατίνες-δέκτες ολοκλήρωσαν με επιτυχία την κυοφορία τους και γέννησαν 115 αρνιά, από τα οποία 4 ήταν θνησιγενή.

Πίνακας 3. Βιωσιμότητα εμβρύων σε σχέση με τον αριθμό των εμβρύων που μεταφέρθηκαν σε προβατίνες-δέκτες
Table 3. Embryo survival in relation to number of embryos transplanted

Αριθμός εμβρύων που επιβίωσαν Foetal burden	Διπλή μεταφορά Twin transplants	Τριπλή μεταφορά Triplet transplants
0	11	2
1	16	4
2	38	8
3	0	3

assessed as being of sufficient quality (Grade 1 or 2) for cryopreservation. These embryos ranged from late morula to expanded blastocyst and following freezing were transported to the UK by airmail. Of the 95 embryos not frozen, 17 were of a too advanced embryonic stage (hatched or collapsed blastocyst) for freezing and the remainder (78) were degenerated or of poor quality.

Embryo thawing and survival

Table 3 shows embryo survival in relation to number of embryos transplanted. Of a total of 198 embryos thawed, 15 embryos (7.8%) had not survived the cryopreservation procedure. Of the 183 embryos deemed viable for transfer, 20 embryos (10.9%) were considered to have been deteriorated in quality below grade 2. The results of ultrasound scanning, 55 days after implantation, revealed that 69 out of the total of 82 recipient ewes were pregnant. Moreover, prior to lambing, 2 recipient ewes aborted and 1 died (all identified as carry twin pregnancies at the time of scanning). The 66 recipient ewes, which lambed successfully, produced 115 lambs of which 4 were stillborn.

Effect of embryonic stage on embryo survival

Table 4 shows the rate of embryo survival as influenced by their stage of development. The analysis of the embryo survival rate in relation to the embryonic stage frozen

Πίνακας 4. Βιωσιμότητα εμβρύων σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξής τους
Table 4. Survival rate of embryos as influenced by their stage of development

Στάδιο ανάπτυξης Stage of development	Αριθμός εμβρύων που μεταφέρθηκαν No of embryos transferred	Αριθμός εμβρύων No of embryos surviving	Ποσοστό επιβίωσης που επιβίωσαν (%) Survival rate (%)
Όψιμο μορίδιο Late morula	23	11	47.8
Πρώιμη βλαστοκύστη Early blastocyst	49	39	79.6
Βλαστοκύστη Blastocyst	45	30	66.7
Πλήρης βλαστοκύστη Expanded blastocyst	47	37	78.7

Στάδιο ανάπτυξης και βιωσιμότητα των εμβρύων

Στον πίνακα 4 δίνεται ο αριθμός των εμβρύων που επιβίωσαν σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξής τους. Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων που αφορούν στη βιωσιμότητα των εμβρύων σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξης στο οποίο καταψύχθηκαν, αποδεικνύει ότι η βιωσιμότητα των βλαστοκύστεων, που αποψύχτηκαν (75%), ήταν σημαντικά ($P<0.001$) μεγαλύτερη από ό,τι εκείνη των μοριδίων (48%).

Διάρκεια κυοφορίας, αύξηση του σωματικού βάρους των γαλουχούμενων αρνιών

Στον πίνακα 5 δίνονται η μέση διάρκεια κυοφορίας των προβατινών-δεκτών καθώς και το σωματικό βάρος στη γέννηση και ο ρυθμός ανάπτυξης των νεογέννητων αρνιών μέχρι την ηλικία των 6 εβδομάδων. Δεν υπήρξαν σημαντικές διαφορές ως προς τη διάρκεια της κυοφορίας των προβατινών και το βάρος στη γέννηση μεταξύ μονόδυμων και δίδυμων αρνιών. Σημαντική ($P<0.01$) διαφορά όμως βρέθηκε στο ρυθμό ανάπτυξης μεταξύ μονόδυμων και δίδυμων αρνιών.

Πίνακας 5. Μέση διάρκεια κυοφορίας, σωματικό βάρος αρνιών στη γέννηση και ρυθμός αύξησής τους μέχρι την ηλικία των 6 εβδομάδων
Table 5. Mean gestation length of recipient ewes, birth weight and growth rate of newborn lambs up to 6 weeks of age

	Μονόδυμα Single	Δίδυμα Twins
Διάρκεια κυοφορίας (ημέρες) Gestation length	150.6	150.5
Σωματικό βάρος στη γέννηση (χλγ.) Birth weight (kg)	3.50	3.40
Ρυθμός ανάπτυξης (χλγ./ημέρα) Growth rate (kg/day)	0.240	0.182

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε αξιολόγηση της εφαρμογής τεχνικών πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας και μεταφοράς εμβρύων από μια εγχώρια φυλή γαλακτοπαραγωγών προβάτων με στόχο τη μεταφορά τους σε προβατίνες-δέκτες σε άλλη χώρα. Χρησιμοποιήσαμε ένα πρωτόκολλο πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας σε επιλεγμένες προβατίνες – δότριες της φυλής Καραγκούνικο, στοχεύοντας στην παραγωγή μεγάλου αριθμού εμβρύων. Στη συνέχεια, έγινε συλλογή των εμβρύων, αξιολόγησή τους και κατάψυξη όσων κρίθηκαν κατάλληλα. Τα κατεψυγμένα έμβρυα μεταφέρθηκαν στη Σκωτία σε προβατίνες – δέκτες της φυλής Scottish blackface. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι τεχνικές που εφαρμόστηκαν είχαν παρόμοια επιτυχία με αντίστοιχες άλλων ερευνητών (Dingwall και συν. 1991, Ishwar and Memon 1996, Bari και συν. 2000). Αναμφίβολα, αυτό είναι σημαντικό, γιατί παρέχει βασικές πλη-

showed that thawed blastocysts (75%) had a significantly superior ($P<0.001$) survival rate than that of morulae (48%).

Gestation length, birth weight and early growth rate

Table 5 shows the average gestation length of recipient ewes, birth weight and growth rate of born lambs up to 6 weeks of age. The difference in gestation length and birth weight between singles and twins was not significant, however, there was a significant difference in the growth rate between single and twins; single born lambs were growing faster ($P< 0.01$).

DISCUSSION

The main objective of this study was to test the possibilities of using multiple ovulation and embryo transfer techniques in an indigenous Greek dairy breed of sheep. We stimulated selected donor ewes of the Karagouniko breed, to produce large numbers of embryos after the induction of multiple ovulation by gonadotropin treatment (superovulatory response). Subsequently, the embryo recovery, along with embryo cryopreservation, embryo survival and

ροφορίες σχετικά με την εφαρμογή της ΠΩΜΕ σε προβατίνες εγχώριων φυλών, οι οποίες εκτρέφονται κάτω από ιδιάζουσες συνθήκες, όπως αυτές της χώρας μας.

Η γενετική βελτίωση των εγχώριων φυλών προβάτων στηρίχθηκε σε μεγάλο βαθμό τα τελευταία χρόνια στην εφαρμογή της τεχνητής σπερματέγχυσης. Θα πρέπει, όμως, να τονιστεί ότι, όπως ακριβώς μέσω της τεχνητής σπερματέγχυσης αξιοποιούνται οι δυνατότητες ενός σπερματοδότη κριού, έτσι και η εφαρμογή της ΠΩΜΕ δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησης θηλυκών ατόμων υψηλής γενετικής αξίας (Ishwar and Memon 1996, Loi και συν. 1998). Το πρωτόκολλο ΠΩΜΕ, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα έρευνα, είχε ως αποτέλεσμα τη συλλογή υψηλού αριθμού ωαρίων και υψηλά ποσοστά γονιμότητας. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν συγκριτικά ευνοϊκότερα από εκείνα που είχαν επιτευχθεί σε προηγούμενες έρευνες με την εφαρμογή παρόμοιων τεχνικών (Dingwall και συν. 1994, Cognie 1999, Bari και συν. 2000). Είναι γνωστό ότι τα προβλήματα που σχετίζονται με τη μεταφορά των εμβρύων μπορούν να αντιμετωπιστούν εύκολα με την κατάψυξή τους (Tervit and Goold 1983, McGinnis και συν. 1993). Η επιτυχία της τεχνικής της κατάψυξης, που εφαρμόστηκε στην παρούσα έρευνα (92,4% των εμβρύων που καταψύχτηκαν, αποψύχτηκαν με επιτυχία), ήταν παρόμοια με εκείνη που αναφέρθηκε σε προγενέστερες έρευνες στα πρόβατα (McGinnis και συν. 1993, Ishwar and Memon 1996, Bari και συν. 2000). Η βιωσιμότητα των εμβρύων (66,1%) ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με άλλα προγράμματα μεταφοράς εμβρύων προβάτων, που χρησιμοποίησαν κατεψυγμένα - αποψυγμένα έμβρυα (Tervit and Goold 1984, Heyman και συν. 1987, McGinnis και συν. 1993, Cocero και συν. 1996). Η αυξημένη βιωσιμότητα των εμβρύων του σταδίου της βλαστοκύστης σε σύγκριση με εκείνο του σταδίου του μοριδίου συμφωνεί με τα ευρήματα των Armstrong and Evans (1983), αλλά διαφέρει από τις παρατηρήσεις του McGinnis και συν (1993), πιθανόν λόγω των διαφορετικών κρυοπροστατευτικών που χρησιμοποιήθηκαν. Όπως προκύπτει από την παρούσα έρευνα το άριστο στάδιο ανάπτυξης των εμβρύων, που προορίζονται για κατάψυξη και εν συνεχεία μεταφορά, είναι εκείνο της πρώιμης βλαστοκύστης. Σε ό,τι αφορά την επιτυχία της μεταφοράς των εμβρύων στις προβατίνες-δέκτες προκύπτει ότι η διάρκεια της κυοφορίας, το βάρος των αρνιών στη γέννηση και ο ρυθμός ανάπτυξής τους στις πρώτες εβδομάδες της ζωής τους είναι παρόμοια με εκείνα που αναφέρονται σε γαλουχούμενα αρνιά της φυλής Καραγκούνικο (Delligiannis 1998). Η προσπάθεια για τη διεθνή μεταφορά εμβρύων από μια εγχώρια γαλακτοπαραγωγό φυλή προβάτων, τη φυλή Καραγκούνικο, είχε αντίστοιχη επιτυχία με προηγούμενες προσπάθειες, σε άλλες χώρες, που στόχο είχαν τη μεταφορά εμβρύων σε μικρά μηρυκαστικά (Russel and Bishop 1990, Brebion και συν. 1992, Singh και συν. 1997, Parker και συν. 1998, Thibier and Guerin 2000).

Με βάση τα αποτελέσματα, θεωρούμε ότι η εφαρμογή της τεχνικής MOET είναι δυνατόν να αποτελέσει ένα ερ-

quality were assessed. The results have shown that the MOET methodology employed here produced a similar superovulatory response to that experienced in other studies (Dingwall et al 1991, Ishwar and Memon 1996, Bari et al 2000). This is important because it provides basic information about the application of MOET in indigenous Greek dairy breeds of sheep reared under a particular climatic, management and production environment. Such information is crucial for adoption of such methodologies by the sheep industry in Greece.

Sheep production in Greece has been well served by the application of artificial insemination (AI) for many years. However, just as the full potential of a ram can be utilised through AI, so the application of MOET allows a much greater impact of selected superior ewes in the genetic development of indigenous breeds of sheep (Ishwar and Memon 1996, Loi et al 1998). In our study, the ova recovery and fertilisation rates also compared favourably with that previously achieved with similar techniques in other studies (Dingwall et al 1994, Cognie 1999, Bari et al 2000). The problems of distribution of embryos can readily be overcome through their long-term storage by cryopreservation (Tervit and Goold 1983, McGinnis et al 1993). The results of our study showed that the success of the cryopreservation technique (92.4% of embryos frozen successfully thawed) was similar to that previously reported in sheep (McGinnis et al 1993, Ishwar and Memon 1996, Bari et al 2000). The embryo survival rate of 66.1% compared favourably with other sheep embryo transfer programmes using frozen - thawed embryos (Tervit and Goold 1984, Heyman et al 1987, McGinnis et al 1993, Cocero et al 1996). The increased embryo survival rate with blastocysts compared to that experienced with morulae is in agreement with the findings of Armstrong and Evans (1983), but was at difference to the observations of McGinnis et al (1993), most likely due to differences in the material used for cryopreservation. On the other hand, the gestation lengths, birth weights and early growth rates were similar to those recorded in the purebred Karagouniko (Delligiannis 1998). The overall success of the exercise in moving ovine embryos across international boundaries followed similar successful movements of small ruminant embryos (Russel and Bishop 1990, Brebion et al 1992, Singh et al 1997, Parker et al 1998, Thibier and Guerin 2000).

Based on the results we suggest that MOET could be used as a tool to force the genetic improvement in dairy sheep production. It is worth noted that, up to now in Greece, MOET has been applied only in dairy cows and only recently few studies have been focusing in sheep (Amiridis et al 1999, Lymberopoulos et al 2001). To our knowledge this is the first attempt to test the technique in indigenous dairy breeds of Greek sheep together with exploring the potential of superior animals to produce more offspring. There is no doubt that the main reasons for the slower uptake of MOET in sheep production is due to the lower economic value of sheep and the technical difficulties

γαλείο για την επιτάχυνση της γενετικής βελτίωσης των εγχώριων φυλών προβάτων. Είναι αξιοσημείωτο ότι μέχρι σήμερα στη χώρα μας, οι μελέτες που αφορούν στην εφαρμογή τεχνικής ΠΩΜΕ στα ελληνικά πρόβατα είναι λιγοστές (Amiridis και συν. 1999, Lymberopoulos και συν. 2001). Η παρούσα έρευνα αποτελεί προσπάθεια εφαρμογής της συγκεκριμένης τεχνικής ΠΩΜΕ σε προβατίνες εγχώριας φυλής γαλακτοπαραγωγών προβάτων με στόχο τη χρησιμοποίηση ζώων υψηλής γενετικής αξίας για την παραγωγή μεγαλύτερου αριθμού απογόνων. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί, ότι όπως προαναφέρθηκε, οι κύριες αιτίες για την καθυστέρηση της εφαρμογής της τεχνικής ΠΩΜΕ στα πρόβατα οφείλονται, κυρίως, στη σχετικά χαμηλή οικονομική αξία των ζώων αυτών, σε σύγκριση π.χ. με τα βοοειδή, και στις τεχνικές δυσκολίες που σχετίζονται με την ανατομία του γεννητικού συστήματος των προβατινών. Τα τελευταία προβλήματα καθιστούν την εφαρμογή της ΠΩΜΕ σε εμπορική κλίμακα αρκετά δύσκολη (Ledda και συν. 1995, Callesen και συν. 1996). Η παρούσα έρευνα οδηγεί στη διαπίστωση ότι η επιτυχία της μεθόδου στα πρόβατα μπορεί να επηρεαστεί από διάφορους παράγοντες όπως και στα άλλα είδη των παραγωγικών ζώων. Είναι γνωστό ότι παράγοντες όπως ο γενότυπος των ζώων, η κατάσταση της υγείας τους και ο δείκτης θρεπτικής κατάστασης, καθώς και η εποχή του έτους, μπορούν να λειτουργήσουν ξεχωριστά ή σε συνδυασμό, ώστε τα αποτελέσματα να είναι ανομοιογενή (Armstrong and Evans 1983, Callesen και συν. 1996, Singh και συν. 1997, Delligiannis 1998, Cognie 1999, Naqvi και συν. 2001).

Συμπερασματικά φαίνεται ότι τα κατεψυγμένα έμβρυα είναι επιτυχές μέσο διεθνούς μεταφοράς πρόβειου γενετικού υλικού, αλλά η επιλογή του σταδίου ανάπτυξης των εμβρύων είναι αποφασιστικής σημασίας. Αν και η παρούσα μελέτη έγινε, κυρίως, για ερευνητικούς σκοπούς, φαίνεται ότι τα αποτελέσματα μπορούν να συμβάλουν θετικά σε μια περισσότερο πρακτική προσέγγιση στο μέλλον. Με δεδομένη την κατάσταση της ελληνικής προβατοτροφίας (Zygoyiannis 1999), θεωρούμε ότι η εφαρμογή τέτοιων τεχνικών πρέπει να διερευνηθεί σε μεγαλύτερη κλίμακα, αφού δίνει τη δυνατότητα για τη μεταφορά γενετικού υλικού από και προς τη χώρα μας. Επιπλέον δίνει τη δυνατότητα διατήρησης γενετικού υλικού από εγχώριες φυλές προβάτων που τείνουν να εξαφανιστούν. Η πρόταση μας είναι να δημιουργηθούν συγκεκριμένες ομάδες από εξειδικευμένους επιστήμονες, οι οποίοι, σε συνεργασία με τα Ερευνητικά Ιδρύματα και ομάδες προβατοτρόφων που συμμετέχουν σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης, θα αναλάβουν την εφαρμογή των τεχνικών πολλαπλής ωοθυλακιορρηξίας και μεταφοράς εμβρύων σε προβατίνες εγχώριων φυλών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα έρευνα χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση (DG VI project No CAMAR 8001 CT 91-0308) και αποτελούσε μέρος ενός κοινού ερευνητικού προγράμματος μεταξύ του Ηνωμένου Βασιλείου, της

associated with such animals that make MOET not commercially popular (Ledda et al 1995, Callesen et al 1996). The above problems together with the technical details, which require accuracy and timing, are vital to the success of the technique. It should be noted here that success of MOET in sheep could be variable just as it can in other farm animals. Factors such as breed, season, age, body condition and certain genetic differences all combine to produce variability in results (Armstrong and Evans 1983, Callesen et al 1996, Singh et al 1997, Delligiannis 1998, Cognie 1999, Naqvi et al 2001).

The current study was performed mainly for experimental purposes, with the prospect of a more practical implementation in the near future. Given the results of this study we argue that within the context of current status of the sheep industry in Greece (Zygoyiannis 1999), such techniques should receive special attention because they facilitate transfer of genetic material both within and outside Greece. Hence, we suggest that specialised teams, which will be linked with research institutes and sheep producers that participate in sheep breed improvement programs, should be responsible for the application of such methodologies.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was supported by the European Community (DG VI) project No CAMAR 8001 CT 91-0308) as a part of a collaborative program between the UK, Greece and Spain. We are grateful to all those who participated in the various aspects of this study. Especially, we would like to thank the experienced team of Edinburgh Genetics, for their expert technical assistance during embryo recovery and transfer. ❑

Ελλάδας και της Ισπανίας. Ευχαριστούμε όλους όσους συμμετείχαν κατά τα διάφορα στάδια της παρούσας έρευνας. Ειδικότερα, θέλουμε να ευχαριστήσουμε την ερευνητική ομάδα του κέντρου γενετικών ερευνών του Εδιμβούργου για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη συλλογή και τη μεταφορά των εμβρύων. ❑

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ - REFERENCES

Amiridis GS, Kiihholzer B, Besenfelder U, Lymberopoulos A, Vainas E (1999) Laparoscopic collection and transfer of chios sheep embryos. Bull. Hell. Vet. Med. Soc., 50:244-249.

ARC, Agricultural Research Council (1990) The nutrient requirements of ruminant livestock. Technical review by an agricultural research council working party. C.A.B International, wallingford, UK,: 145-150.

Armstrong DT, Evans G (1983) Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. Theriogenology, 19: 31-42.

Bari F, Khalid M, Haresign W, Murray A, Merrel B (2000) Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a MOET program in sheep. Theriogenology, 53: 727-742.

Boundy T, Clarkson MJ, Winter AC (1985) Embryo transfer in sheep under practice conditions. Vet Rec 117: 379-381.

Brebion P, Baril G, Cognie Y, Vallet JC (1992) Embryo transfer in sheep and goats. Ann Zootech., 41: 331-339.

Callesen H, Liboriussen T, Greve T (1996) Practical aspects of multiple ovulation –embryo tranfer in cattle. Anim. Reprod. Sci., 42: 215-226.

Cocero MJ, Sebastian AL, Barragan ML, Picazo RA (1996) Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. Cryobiology, 33: 502-507.

Cognie Y (1999) State of the art in sheep-goat embryo transfer. Theriogenology, 51: 105-116.

Delligiannis K (1998) The effect of time of parturition and body condition score in reproductive performance of Karagouniko ewes. Doctoral Thesis, Aristotle University of Thessaloniki, Greece.

Dingwall WS, Femie K, Fitzsimons J, McKelvey WAC (1991) MOET in Suffolks: Increasingthe superovulation rate. Anim. Prod., 52: 612-613.

Dingwall WS, McKelvey WAC, Mylne MJA, Simm G (1994) A protocol for MOET in Suffolk sheep. In: Programme and abstracts of the 45th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Edinburgh, : 256.

Foote WC, Clark W, Maciulis A, Call JW, Hourrigan J, Evans RC, Marshall MR, Decamp M (1993) Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer. American J. Vet. Res., 54:1863-1868.

Lawes Agricultural Trust (1993) Genstat 5 Release 3.2, 2nd edition, Rothamsted, UK.

Heyman Y, Vincent C, Gamier V, Cognie Y (1987) Transfer of frozen-thawed embryos in sheep. Vet. Rec., 120:83-85.

Ishwar AK, Memon MA (1996) Embryo transfer in sheep and goats: a review. Small Ruminant Res., 19: 35-43.

Ledda S, Naitana S, Loi P, Dattena M, Gallus M, Branca A, Cappai P (1995) Embryo recovery from superovulated mouflons (Ovis gmelini musimon) and viability after transfer into domestic sheep. Anim. Reprod. Sci., 39:109-117.

Lohuis MM (1995) Potential of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. Theriogenology, 43:51-60.

Loi P, Boyazoglou S, Fulka J, Naitana S, Cappai P (1999). Embryo cloning by nuclear transfer: experiences in sheep. Livest. Prod. Sci., 60: 281-294.

Loi P, Ptak G, Dattena M, Ledda S, Naitana S, Cappai P (1998) Embryo transfer and related technologies in sheep reproduction. Reprod. Nutr. Development, 38:615-628.

Lymberopoulos AG, Amiridis GS, Kiihholzer B, Besenfelder U, Christodoulou V, Vainas E, Brem G (2001) Fertilazation and embryo recovery rates in superovulated chios ewe after laparoscopic intrauterine insemination. Theriogenology, 55:1855-1862

McGinnis LK, Duplantis JrSC, Youngs C (1993) Cryopreservation of sheep embryos using ethylene glycol. Anim. Reprod. Sci., 30:273-280.

McKelvey B (1999). AI and embryo transfer for genetic improvement in sheep: the current scene. In Practice, 21: 190-195.

McKelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP, Robertson IS (1986) Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. Theriogenology, 25: 855-865.

McKelvey WAC, Robinson JJ, Aitken RP (1985) A simplified technique for the transfer of ovine embryos by laparoscopy. Vet. Rec., 117: 493-494.

McKelvey WAC, Simm G (1995) Intrauterine insemination, transcervical insemination and embryo transfer for practical breed improvement in small ruminants. Proceedings of the 46th annual meeting of the European Association for Animal Production, Prague, : 1-12.

Naqvi SMK, Joshi A, Das GK, Mittal JP (2001) Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. Small Ruminant Res., 39:199-208.

Parker BNJ, Wrathall AE, Saunders RW, Dawson M, Done SH, Francis PG, Dexter I, Bradley R (1998) Prevention of transmission of sheep pulmonary adenomatosis by embryo transfer. Vet. Rec. 142: 687-689.

Russel AJF, Bishop SC (1990) Breeding for cashmere in Feral and imported goats in Scotland. Proc. of the 4th World Cong. on Genetics Applied to Livestock Production, Edinburgh: 205-206.

Saberivand A, Outteridge PM (1996) The use of embryo genotyping in the propagation of genes involved in the immune response. Immunology and cell Biology 74: 109-120.

Singh EL, Dulac GC, Henderson JM (1997) Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. Failure to transmit bluetongue virus through the transfer of embryos from viremic sheep donors. Theriogenology, 47:1205-1214.

Singh EL (1988) The potential of semen and embryos for introducing pathogens into the uterus. Proc. of the 11th Int. Cong. on Animal Reprod. and AI, Dublin, 5:72-79.

Tervit HR, Goold PG (1984) Deep freezing sheep embryos. Theriogenology, 21:266.

Thibier M, Guerin B (2000) Embryo transfer in small ruminants: the method of choice for health control in germplasm exchanges. Livest. Prod. Sci., 62:253-270.

Wilmut I, Haley CS, Wooliams JA (1992) Impact of biotechnology to animal breeding. Anim. Reprod. Sci., 28:149-162.

Zygoyiannis D. (1999). Sheep Husbandry. Sygxroni Paideia, Thessaloniki: 23-27.