✓ پژوهش و سازندگی، شماره ۴۰، ۴۱، ۴۲ بهار ۱۳۷۸

بررسی جمعیت فولیکولها و جمع آوری اووسیت و بلوغ داخل آزمایشگاهی اووسیت در گاوهای بومی منطقه فارس

● **محمدرحیم احمدی**، بخش مامایی - دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
● **مجتبی کافی**، بخش مامایی - دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز
● **محمود قربانزاده**، دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: آبان ماه ۱۳۷۷

چکیده

بسیاری از گاوها به دلیل مشکلات گوناگون راهی کشتارگاه می‌شوند و گاهی در بین آنها گاوهای با ارزشی از نظر ژنتیکی هم وجود دارند، لقاح در محیط آزمایشگاه این امکان را می‌دهد تا حتی پس از کشتار با تولید جنین بتوانیم ذخایر ژنتیکی آنها را حفظ و به نسلهای بعد منتقل کنیم. هدف از مطالعه حاضر، اولاً: بررسی جمعیت فولیکولها در اندازه‌های مختلف، جمع‌آوری و طبقه‌بندی اووسیت‌های گاو بومی منطقه فارس و ثانیاً: تلاش جهت کشت و بلوغ اووسیت‌های به دست آمده در محیط آزمایشگاه بود. تخمدانهای ۲۲ گاو بومی ذبح شده در حرارت ۳۷ درجه سانتگیراد در مدت کمتر از یک ساعت جهت بررسی فولیکول‌های کوچک‌تر و مساوی یا بزرگ‌تر از ۶ میلیمتر شمارش و سپس درجه‌بندی اووسیت‌های به دست آمده به آزمایشگاه منتقل شد. نتایج حاصل از بخش اول مطالعه نشان داد که میانگین تعداد فولیکول‌ها، فولیکول‌های بزرگ‌تر یا مساوی ۶ میلیمتر، کل اووسیت‌های به دست آمده و اووسیت‌های خوب از تخمدان چپ به طور معنی‌داری از تخمدان راست بیشتر بوده است ($P<0/05$) و ۶۰ درصد جسم زردها در تخمدانهای چپ مشاهده شد. در ضمن میانگین تعداد اووسیت جمع‌آوری شده از هر تخمدان ۲/۴۵ بود. در بخش دوم مطالعه اووسیت‌های مناسب جهت بلوغ کشت داده شدند که در ۳۲٪ اووسیتها انبساط سلولهای کومولوس آنهاکه خود از نشانه‌های بلوغ اووسیت و آمادگی آن جهت لقاح در محیط کشت (IVF) می‌باشند مشاهده گردید.

✓ **Pajouhesh & Sazandegi, No 40, 41, 42 PP: 124-127**

Follicular population, oocyte collection and attemtps for in vitro maturation of oocytes of cattle native to Fars area.

By: Ahmadi M.R., Kafi M.*, & Ghorbanzadeh, M.**, * Department of Obstetrics, veterinary faculty of Shiraz University. ** Graduated from veterinary faculty of Shiraz University.*

Ovaries of 22 slaughtered native cattle were immediately collected and transported in a 37 $^{\circ}$C normal saline to the laboratory. Follicles in different sizes were counted and the distribution of follicular population on the right and left ovaries was determined. In addition, follicular oocytes were aspirated, identified and then classified based on their appearance and cumulus cells investment. Attempt was made to culture good quality of oocytes in TCM 199 with 10% FCS. This study showed that the mean number of follicles (>6mm) (1.5±1.07 VS 0.9±1.13), the mean number of collected oocytes (3.09±1.4 VS 1,81±1.15) and the mean number of good quality oocytes collected (2.80±1.14 VS 1.18±0.82) from the left ovary were significantly ($P<0.05$) higher than the right ovary. Further, 60 percent of corpora lutea were observed to present on the left ovary, Thirty two percent of the cultured oocytes showed signs of cumulous cell expansion after 24h. Culture period.

مقدمه

به طور طبیعی در هر چرخه فحلی گاو یک فولیکول و یا ندرتاً دو فولیکول مراحل نهائی رشد را طی کرده و تخمک‌گذاری می‌کنند (۱۰). رشد فولیکولها در تخمدان گاو به صورت موجی است. در هر موج فولیکولی تعداد ۵ تا ۱۰ فولیکول روی هر تخمدان به طور همزمان شروع به رشد می‌کنند (۱۲). رشد فولیکولها به صورت موج با انجام اولتراسونوگرافی متوالی قابل مشاهده است. غالباً در چرخه فحلی گاو ۲ یا ۳ موج فولیکولی وجود دارد. یک یا دو روز پس از آن که موج فولیکولی قابل مشاهده گردید، یکی از فولیکولها رشد بیشتر و مشخصی نسبت به سایر فولیکول‌ها پیدا می‌کند که این فولیکول اصطلاحاً «فولیکول غالب» خوانده می‌شود. بقیه فولیکول‌های هر موج از ادامه رشد باز می‌مانند و نهایتاً تحلیل می‌روند.

وضعیت بدنی (۱۷)، نژاد (۶) و شرایط محیطی (۱۷) از جمله عوامل مؤثر روی رشد فولیکول‌ها هستند. Dominguez در سال ۱۹۹۵ گزارش کرد که اندازهٔ فولیکول‌های قابل تخمک‌گذاری در نژادهای اروپائی بزرگتر از گاوهای زبو و آمیخته‌ها است. همچنین Segerson و همکاران (۱۹۸۴) تعداد بیشتری فولیکول بزرگتر از ۵ میلیمتر را در روز ۱۷ چرخه فحلی در گاوهای نژاد آنگوس در مقایسه با گاوهای برهما مشاهده کردند. D'Occhio و همکاران (۱۹۹۰) غلظت بالاتر LH را در مرحله پس از زایش در گاوهای اروپائی در مقایسه با گاوهای *Bos indicus* مشاهده کردند.

مطالعات Lucy و همکاران نشان داده است که موازنه انرژی در اوایل دوره شیردهی با رشد فولیکولها مرتبط است. گاوهای با موازنه انرژی بالاتر دارای تعداد فولیکولهای بیشتر در اندازه‌های کوچک و ۱۰ تا ۱۵ میلیمتر هستند. همچنین مشاهده شد اولین تخمک‌گذاری پس از زایش در گاوهای با موازنه بالاتر زودتر از گاوهای دارای موازنه منفی روی داد. برخی مطالعات کیفیت اووسیت را نیز تابعی از وضعیت بدنی و تغییرات متابولیکی در گاو دانسته‌اند(۶).

مطالعات موفقیت‌آمیز متعددی در دهه گذشته روی بیولوژی رشد اووسیت و تولید جنین داخل آزمایشگاهی در گاو صورت گرفته است. در مطالعه‌ای که Longergan و همکاران (۱۹۹۴) انجام دادند، از

فولیکولهای ۲ تا ۶ میلیمتری تعداد اوسیت بیشتری در مقایسه با فولیکولهای بزرگتر از ۶ میلیمتری به دست آوردند (۷۷٪ در مقابل ۸۷/۷٪). میزان تقسیم (Cleavage Rate) سلولی زایگوت‌ها در اووسیت‌هایی که از فولیکولهای کوچک (۶-۲ میلیمتر) و بزرگتر از ۶ میلیمتر تفاوتی نداشتند، ولی تعداد بلاستوسیت‌های به دست آمده از اووسیت‌های جمع‌آوری شده از فولیکولهای بزرگتر از ۶ میلیمتر بیشتر گزارش شد (۶۵/۹٪ و ۳۹/۵٪ (۱۶). این یافته در مطالعات Tan و Lu (۱۹۹۰) نیز گزارش شده است (۲۴).

Rajkaski در سال ۱۹۶۰، Pierson و Ginther در سال ۱۹۸۷ و Ginther و همکاران در سال ۱۹۸۹ گزارش کردند که فعایت فولیکولی در تخمدان راست و تعداد فولیکولهای بزرگتر از ۵ میلیمتر در تخمدان راست گاوهای هلشتاین بیشتر است. در مطالعات اولتراسونیک مشخص شد که در این گاوها فولیکول غالب موج اول بیشتر در تخمدان راست تکمیل و رشد می‌یابد (۵۸٪) و تخمک‌گذاری نیز بیشتر در تخمدان راست اتفاق می‌افتد (۶۳٪) (۹).

لقاح اووسیتها در محیط آزمایشگاه (IVF) به منظور افزایش تولید و پیشرفت ژنتیکی در گاو به کار گرفته شده است. از آن جا که بسیاری از گاوها به دلیل مشکلات گوناگون راهی کشتارگاه می‌شوند و گاهی در بین آنها گاوهای با ارزشی از نظر ژنتیکی هم وجود دارند، لقاح در محیط آزمایشگاه این امکان را می‌دهد تا حتی پس از کشتار با تولید جنین بتوانیم ذخایر ژنتیکی آنها را حفظ و به نسلهای بعد منتقل کنیم. هدف از مطالعه حاضر: الف) بررسی جعیت فولیکولها در اندازه‌های مختلف، جمع‌آوری و طبقه‌بندی اووسیتهای گاو بومی منطقه فارس ب) تلاش جهت کشت و بلوغ اووسیت‌های به دست آمده در محیط آزمایشگاه بود.

مواد و روشها

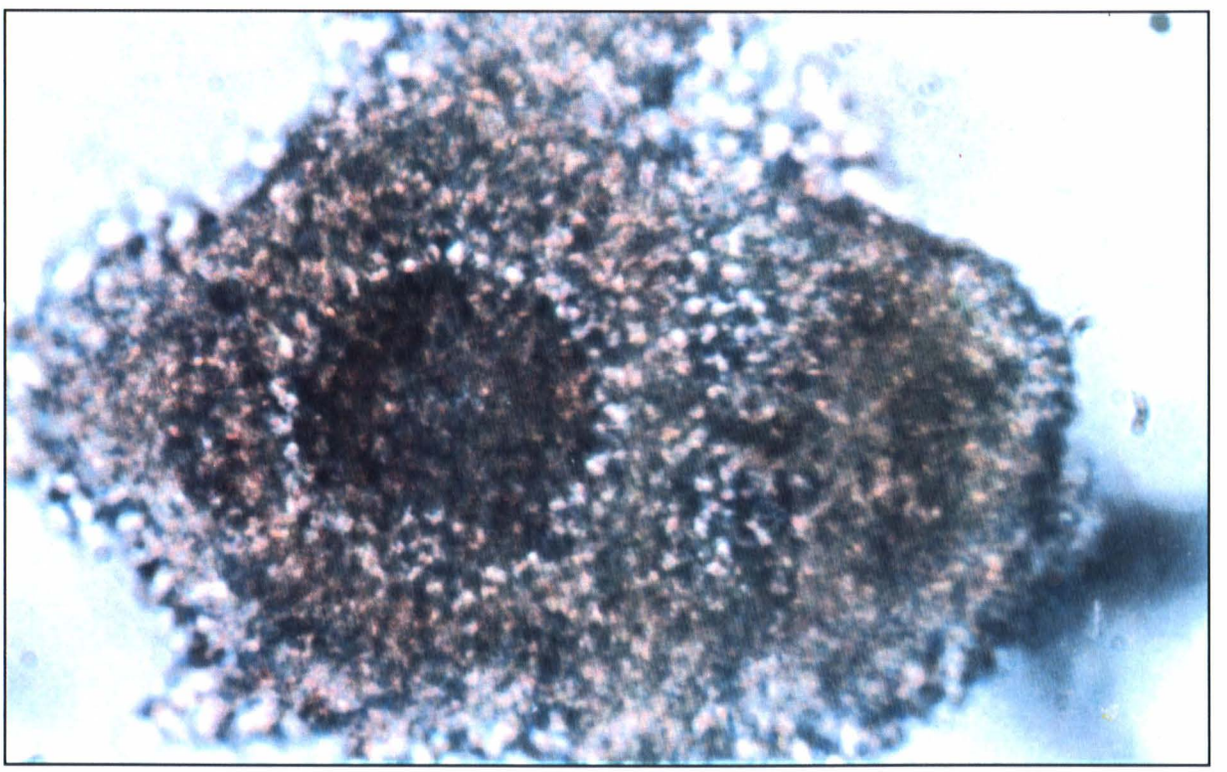
آزمایش اول

دستگاه تناسلی ۲۲ گاو ماده بومی به طور کامل جدا شده و تخمدانهای چپ و راست را مشخص کرده و در ظرف‌های جداگانه و دارای علامت درون فلاسک حاوی سرم فیزیولوژی ۳۷ درجه سانتیگراد گذاشته می‌شدند. نمونه‌ها در کمتر از یک ساعت به آزمایشگاه بخش مامائی دانشکده دامپزشکی شیراز انتقال و فرمول تخمدانی هر نمونه ثبت می‌گردید. فولیکولها به دو گروه کوچکتر از ۶ میلیمتر و بزرگتر یا مساوی ۶ میلیمتر تقسیم‌بندی شده و تعداد هر گروه از فولیکولها در تخمدان شمارش و یادداشت می‌شد (۱۶). بعد از انجام مراحل فوق، با سر سوزن شماره ۱۸ **فولیکولهای موجود بر روی تخمدان آسپیره شده و مایع فولیکولی به دست آمده از فولیکولهای تخمدان چپ و راست در پتری‌های کوچک با اندازه ۲۵ میلیمتر به طور مجزا ریخته می‌شد. توسط یک میکروسکوپ تشریح با بزرگنمایی ۵۰ اقدام به شناسایی و شمارش اووسیت‌های هر تخمدان و ارزیابی کیفیت آنها بر اساس وجود یا عدم وجود لایه‌های کومولوس گردید.** اووسیت‌های دارای لایه‌های سلولهای کومولوس به عنوان اووسیت مناسب و اووسیت‌های بدون سلولهای کومولوس در گروه نامناسب تقسیم‌بندی شدند. جهت تحلیل آماری داده‌ها، از t-test استفاده شد. سطح معنی‌داری در حد ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

آزمایش دوم

تخمدانها حداکثر در مدت نیم ساعت بعد از ذبح گاو از لاشه جدا و در کمتر از یکساعت بعد از کشتار در سرم فیزیولوژی استریل ۳۷ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل می‌گردید. دمای داخل آزمایشگاه در حد ۲۵ درجه سانتیگراد تنظیم و محیط کشت بلوغ اووسیت‌ها از ۲ ساعت قبل در انکوباتور CO_2 قرار داشت (۱۶، ۱۸ و ۲۲). تخمدانها را بر روی تامپون استریل قرار داده تا آب اضافی گرفته شود و با سرنگهای یکبار مصرف و با سرسوزن نمره ۱۸ فولیکولها آسپیره می‌شدند (۱۱ و ۶). مایع به دست آمده از فولیکولها را در پتری‌دیش (۵۰mm) استریل که از قبل گرم شده بود، ریخته و زیر میکروسکوپ تشریح (بزرگنمائی ۵۰) اقدام به بررسی و ارزیابی اووسیتها می‌شد (۳، ۱۶ و ۱۸). اووسیت‌های خوب (تصویر ۱) توسط پیپت پاستور به محیط کشت از قبل آماده شده منتقل کرده و ۲ بار در این محیط شستشو داده می‌شدند. تمام مراحل این آزمایش با استفاده از دستکش و ماسک برای جلوگیری از آلودگی اووسیتها استفاده می‌شد.

محیط کشت عبارت بود از: پودر TCM-199 (ساخت شرکت ICN)، سرم جنین گاوی ۱۰٪ (FCS-تولید جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی تهران)، محلول پنی‌سیلین (۱۰۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و بیکربنات سدیم (۲mmol) (pH=۷/۵-۸) (۱۱). در یک پتری دیش (۲۵mm) در سه ناحیه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محیط کشت به صورت قطره آماده می‌شد و سپس تعداد ۵-۳ اووسیت به وسیله سرنگ توبرکولین برداشته و در قطرات محیط کشت ۳ بار شستشو داده



تصور شماره ۱- کمپلکس اووسیت - کومولوس قبل از کشت.

جدول شماره ۱- نتایج بررسی وضعیت فولیکولها، جسم زرد و اووسیت به دست آمده

وضعیت تخمدانها	تخمدان چپ		تخمدان راست	
	تعداد	میانگین	تعداد	میانگین
تعداد جسم زرد	۱۲		۸	
تعداد کل فولیکول	۱۱۳	۵/۱۳±۲/۳۳	۹۶	۴/۳۶±۱/۹۵*
تعداد فولیکول ۶ ≥ میلیمتر	۳۳	۱/۵±۱/۰۷	۲۰	۰/۹±۱/۱۳*
تعداد فولیکول ۶> میلیمتر	۸۰	۳/۶۳±۱/۹۲	۷۶	۳/۴۵±۱/۶۵*
تعداد کل اووسیت به دست آمده	۶۸	۳/۰۹±۱/۴	۴۰	۱/۸۱±۱/۱۵*
تعداد اووسیت خوب	۴۶	۲/۸±۱/۱۴	۲۶	۱/۱۸±۰/۸۲*

می‌شد. پس از ۳ بار شستشو، اووسیت‌ها در قطرات کشت گذاشته شدند و روی آنها با پارافین پوشانده می‌شد (۱۱، ۱۶، ۱۸ و ۲۲). سپس پتری دیش‌ها در هر نوبت به انکوباتور دارای ۵ درصد CO_2 مرطوب در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده می‌شدند (۲). پس از ۲۴ ساعت از انکوباتور خارج و اووسیتها زیر میکروسکوپ تشریح از لحاظ انبساط سلولهای کومولوس مورد ارزیابی قرار گرفتند. ارزیابی براساس وقوع انبساط کامل (Expansion) در سلولهای کومولوس اطراف اووسیتها ومشاهده‌افزایش فضای بین زوناپلوسیداوغشای ویتلوس (PVS) صورت گرفت (۱۱).

نتایج آزمایش اول

نتایج حاصل از بررسی تخمدانهای ۲۲ رأس گاو ماده بومی منطقه فارس نشان می‌دهد که از ۲۰ جسم زرد در ۱۲ مورد (۶۰٪) جسم زردها در تخمدان چپ گاوها بوده است. میانگین تعداد کل فولیکول‌ها، فولیکولهای بزرگتر یا مساوی ۶ میلی‌متر، کل اووسیت به دست آمده و اووسیت‌های خوب از تخمدانهای چپ به طور معنی‌داری از تخمدانهای راست بیشتر بوده است ($P<0/05$). ولی میانگین تعداد فولیکولهای کوچکتر از ۶ میلیمتر در تخمدان چپ اگر چه بیشتر است ولیکن این اختلاف معنی‌دار نیست (جدول ۱).

نتایج تجربه دوم

در کشت‌های دفعات اول و دوم هیچ رشدی در اووسیتها مشاهده نگردید و اغلب اووسیتها دژنره شده بودند، ولی در دفعات بعدی کشت موفق به ایجاد انبساط در سلولهای کومولوس اووسیتهای کشت شده به دست آمده از گاوهای بومی منطقه فارس، ۳۲٪ از اووسیتها انبساط سلولهای کومولوس اطراف خود راکه یکی از نشانه‌های بلوغ اووسیت و آمادگی آن جهت لقاح در محیط کشت (IVF) می‌باشند را نشان دادند (تصویر ۲).

بحث

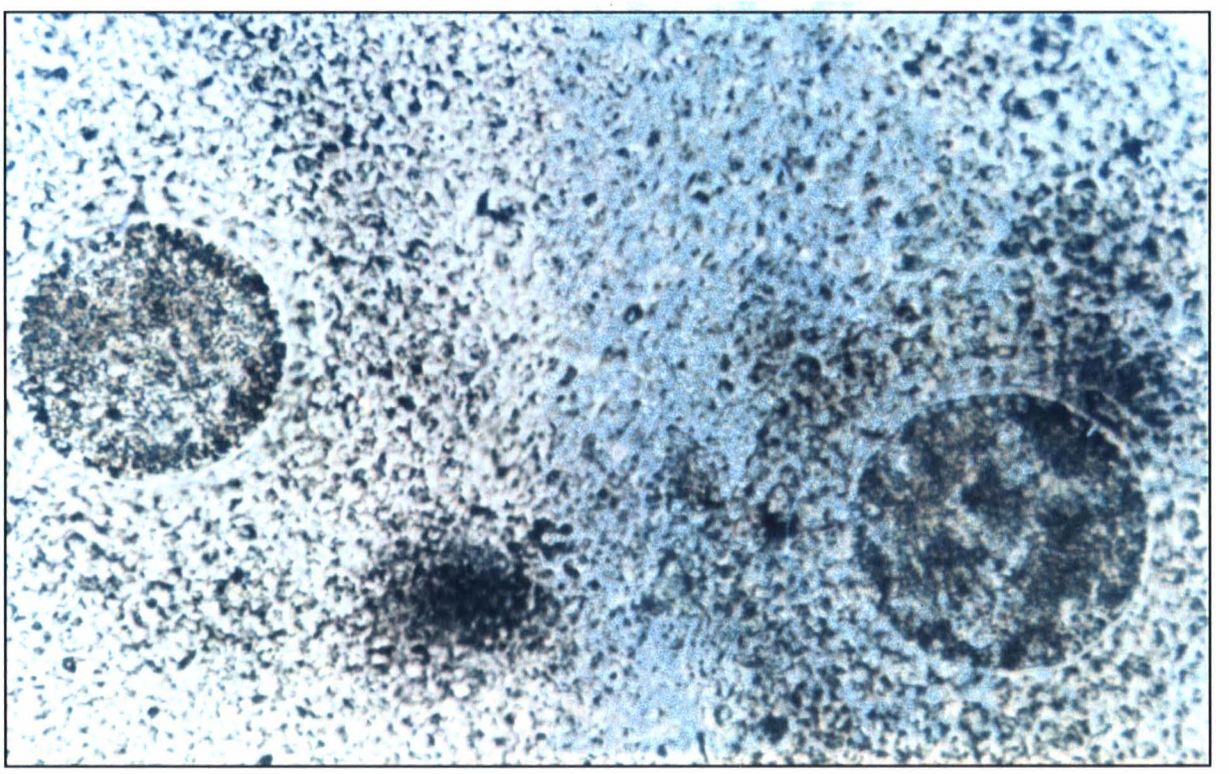
در مطالعه حاضر تعداد کل فولیکولها، فولیکولهای بزرگتر و مساوی ۶ میلیمتر، تعداد اووسیت به دست آمده و تعداد اووسیت با کیفیت خوب از تخمدان چپ و تعداد اووسیت با کیفیت مناسب از تخمدان چپ به طور معنی‌داری از موارد فوق در تخمدان راست بیشتر بوده است، که با نتایج تحقیقات انجام شده در گاوهای هلشتاین مطابقت ندارد (۱۹ و ۸).

نتایج حاصله از این آزمایش نشان می‌دهد که احتمالاً رشد فولیکولها و تخمک‌گذاری در تخمدان چپ گاوهای بومی فارس بیشتر از تخمدان راست است و با آنچه در گاوهای هلشتاین گزارش شده متفاوت است. حضور ۶۰٪ جسم زرد روی تخمدان چپ گاوهای بومی نیز مؤید این مطلب می‌باشد.

در این مطالعه میانگین تعداد اووسیت جمع‌آوری شده از هر تخمدان ۲/۴۵ بود. Carolan و همکاران (۱۹۹۴) توانستند از هر تخمدان گاوهای هلشتاین کشتار شده به طور متوسط ۱۳/۹ اووسیت به دست آورند. علت تفاوت قابل توجه در تعداد اووسیت جمع‌آوری شده در این دو مطالعه روش و مهارت عامل جمع‌آوری، کوچکتر بودن اندازه تخمدان و وجود تعداد فولیکول کمتر روی تخمدان گاوهای بومی در مقایسه با تخمدان گاوهای هلشتاین بود.

Madison در سال ۱۹۹۲ از ۱۹۹-Tcm همراه با سرم گاو و در مرحله استروس و Lonergan در سال ۱۹۹۴ از ۱۹۹-Tcm همراه با سرم گاو نر اخته جهت بلوغ اووسیت‌های گاو در محیط کشت استفاده کردند (۱۶). در مطالعه حاضر در محیط کشت از هورمونها استفاده نشد.

Foot و Thiabult (۱۹۶۹) و Sirard و همکاران



تصویر شماره ۲- کمپلکس اووسیت - کومولوس بعد از کشت - انبساط سلولهای کومولوس اطراف اووسیت قابل مشاهده است.

(۱۹۸۸) در مطالعات خود به این نتیجه رسیدند که اضافه کردن استروئیدها به محیط کشت اووسیت تأثیری در میزان بلوغ آنها ندارد. اما مطالعه‌ای که Fukui و همکاران در سال ۱۹۸۲ انجام دادند چنین اظهار کردند که اضافه کردن استرادیول و پروژسترون بلوغ اووسیتهای گاو را در محیط کشت بهبود بخشید (۸).

Xu و همکاران (۱۹۸۶) گزارش کردند که میزان بلوغ در حضور HCG و استروژن ۷۹/۱٪ و در غیاب آنها ۴۸/۶٪ می‌باشد (۲۵). Leibfried و همکاران (۱۹۸۹) اظهار کردند، معمولاً FSH، LH و استرادیول ۱۷ بتا به محیط کشت اضافه می‌شود، ولی حضور یا عدم حضور هورمونها تأثیر زیادی در بلوغ اووسیتها ندارد. اما هنگامی که هورمونها به محیط اضافه می‌شوند تعداد بلاستوسیست بیشتری حاصل می‌شود (۱۵).

در مطالعه حاضر ۳۲٪ اووسیتهای کشت شده بالغ شدند. King و همکاران در سال ۱۹۸۶ توانستند ۳۶/۴٪ اووسیتهای کشت شده را بالغ کنند (۱۳). De Loss و همکاران (۱۹۸۹) توانستند ۶۶٪ اووسیتهایی را که دارای لایه‌های متراکم کومولوس بودند، در محیط کشت بالغ نمایند (۴). Shamsudin و همکاران (۱۹۹۳) با استفاده از دو محیط با شرایط مختلف نتایج متفاوتی را به دست آورند، آنها موفق شدند ۶۰٪ از اووسیت‌های کشت شده را در اتمسفر هوا بالغ کنند و حدود ۳۴/۴٪ اووسیتهای کشت شده در اتمسفر ۵٪، دی اکسید کربن را نیز بالغ نمایند (۲۲).

تنوع در میزان نتایج در مطالعات مختلف زیاد است که این اختلاف را می‌توان به دلیل استفاده از محیط‌های کشت مختلف که ساخت شرکت‌های متفاوت است، شرایط متنوع کشت، استفاده یا عدم استفاده از هورمونها و استفاده از بافرهای مختلف و سرم‌های مختلف در محیط کشت توجیه کرد.

نتایج حاصله از آزمایش دوم نشان می‌دهد کشت و بلوغ اووسیت گاوی بومی در سطح سلولهای کومولوس در شرایط آزمایشگاهی قابل انجام است. انبساط سلولهای کومولوس اووسیتها یکی از نشانه‌های بلوغ اووسیت در شرایط داخل بدن و داخل آزمایشگاه می‌باشد.

تشکر و قدردانی

در خاتمه از زحمات و همکاری آقایان مهندس زین‌العابدین تقی‌پور و مهندس خسرو مقدسی در انجام عملیات و از سرکار خانم شریف‌پور جهت تایپ مقاله سپاسگزارم.

منابع مورد استفاده

1- Carolan. C, Monaghan. M, Gallagher. M, Gordon. J 1994. Effect of recovery method on yeild bovine oocyte per ovary and their developmental competence after maturation fertilization and culture in vitro. Theriogenology. 41. 1061-1068.

2- Chang, M.C. 1968. In vitro fertilization of mammalian. J. Anim. Sci. Suppl. 1, 15.

3- Choon-keun. Park. 1991. Studies on fertilization and development in vitro of bovine ooytes matured in culture. Doctor thesis Okayama University.

4- De loss, F. Van Vliet, C. Guan Maurik, P. and Kruip, A. M. 1989. Morphology of immature bovine oocytes. Gamete Research. 24: 197-204.

5- D'Occhio, M. J. Neish, A. Broadhurst, L. 1990. Differences in gonadotrophin secretion post partum between Zebu and European breed cattle. Anim. Reprod. Sci. 22: 311-317.

6- Dominguez, M.M. 1995. Effects of body condition, Reproductive states and breed on follicular population and oocyte quality in cows. Theriogenology. 43: 1405-1418.

7- Foote, W.D. and Thibault, C. 1969. Investigations on in vitro maturation of cow and pig oocytes. Ann. Biol. Biochim. Biophys. 9: 329.

8- Fukui, Y. Fukushima, M. Terawaki, Y. and Ono, H. 1982. Effect of gonadotrophins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro. Theriogenlogy. 18: 161.

9- Ginther. O. J, Kastelic, J. P, Knop F. L, 1989. Intra ovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. Theriogenology. 32: 787-794.

10- Hafez. E. S. E. 1993. Reproduction in farm animal. Lea & Febriger, Philadelphia. PP: 461-502.

11- Kafi, M. ph.D, Thesis. 1995. The University of Queensland-Australia.

12- Kastelic, J.P. 1994. Understanding ovarian follicular development in cattle. Veterinary Medicine. January 64-71.

13- King, W. Bousquet, A.D. Creve, T. and Coff, A. K. 1986. Meiosis in bovine oocytes matured in vitro and invivo. Acta. Vet. Scand. 27: 267-276.

14- Leibfried, M. Rutledg, L. Gritser, E.S. Parrish, J.J. and First, N.L. 1986. Meiosis in bovine oocytes matured in vitro and invivo. Acta. Vet. Scand. 27: 267-276.

15- Liu, J.M. In, Z.Q. Chaox, X. and Zhu, Y.D. 1991. The development of bovine follicular oocytes matured in different culture media. Vet. Research. 15: 257-260.

16- Lonergan P. Monoghan. P., Rizos. D, Boland M.P, Gordon. L, 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developental competence following maturation, fertilization, and culture invitro. Molecular reproduction and development. 37: 48-53.

17- Lucy, M.C. Staples, C.R. Michel, F. M. Thatcher, W.W. 1991. Energy balance and size and postpartum dairy cows. J. Dairy sci. 74: 473-482.

18- Madison, V. Avery, B. and Greve, T. 1992. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. Animal Reproduction science. 27: 1-11.

19- Pierson, R.A. and Ginther, O.J. 1987. Follicular population during the estrous cycle in heifers. II. Influence of right and left sides and intraovarian effect of curpus luteum. Animal reproduction science. 14: 177-186.

20- Rajakoski, G. 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifer with special reference to seasonal, cyclical, and left-right variation. Acta endocrinology. 521 (Suppl): 1-67.

21- Segerson, E. C. Hansen, T.R. Libby, D.W. Rondel, R.D. Getz, W.R. 1984. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. J. Animal Sci. 59: 1026-1046.

22- Shamsudin, M.Larsson, B. Rodriguez-Martines, H. 1993. Maturation-ralated changes in bovine oocytes under different culture condition. Animal Repord. Sci. 39:49-60.

23- Sirard, M.A. Parrish, J.J. Ware, C.B. Leibfried, M. Rutledge, M.L. First, N.L. 1988. The culture of bovine oocytes developmentally competent embryos. Biol. Reprod. 39: 546-552.

24- Tan, S.J.Lu, K.H. 1990. Effects of different oestrus cycle stages of ovaries and sizes of follicules on generation of IVF early embryos.Theriogenology33:335.

25- Xu, K.P. Creve, T. Smith, S. and Hyttel, P. 1986. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. Acta Vet. Scand. 27: 505-519.