Archive of SID

لقاح آزمایشگاهی و مراحل اولیه رشد رویان در گاومیش

دکتر محسن عباسی[1] دکتر رجبعلی صدرخانلو[2]

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۳، ۳۶-۳۳، (۱۳۷۹)

لقاح آزمایشگاهی یکی از روشهای عمده جهت تولید دامهای باارزش ژنتیکی برتر می‌باشد. در بررسی حاضر به‌منظور انجام فرآیند لقاح آزمایشگاهی از تخمدان گاومیشهای کشتارشده جهت استحصال اووسیت استفاده گردید و با توجه به مشخصات سلولهای کومولوسی، اووسیت‌ها به چهار دسته تقسیم شدند. اووسیت‌های قابل کشت، در محیط کشت Ham's F10 که با ۱۰ درصد سرم گاومیش فحل تکمیل شده بود، در حرارت ۳۹ درجه سانتیگراد در انکوباتور با ۵ درصد گاز دی‌اکسیدکربن کشت شدند. پس از طی ۲۰ ساعت از کشت، اووسیت‌ها با استفاده از اسپرمهای قابلیت‌یابی شده لقاح یافتند. به‌منظور پیشرفت مراحل اولیه رشد، اووسیت‌های لقاح‌یافته به محیطهای تازه انتقال داده شدند. نتایج نشان داد که ۷۹/۶ درصد اووسیت‌های قابل کشت، بالغ شده و ۳۱/۷ درصد اووسیت‌های لقاح‌یافته، تسهیم یافتند.

واژه‌های کلیدی : گاومیش، اووسیت، بلوغ، لقاح، کشت.

در سالهای اخیر تکنیک لقاح آزمایشگاهی ("In Vitro Fertilization "IVF) به‌طور رایج و موفقیت‌آمیز در تولید دامهای اهلی به‌کار می‌رود و در این فرآیند از اووسیت‌های (Oocyte) حاصل از تخمدانهای جمع‌آوری‌شده از کشتارگاه استفاده می‌کنند (۲۲). فرآیند لقاح آزمایشگاهی شامل بلوغ و لقاح اووسیت (Ootid) با استفاده از اسپرمهای قابلیت‌یافته (Capacitation) در شرایط آزمایشگاه می‌باشد (۱۵). رشد اووسیت پستانداران در مرحله دیپلوتن از پروفاز اولین تقسیم میوز در تخمدان متوقف می‌شود (۱۹). با آزادشدن اووسیت از فولیکولهای حفره‌دار (Antral)، اووسیت در محیط کشت متحمل بلوغ خودبخودی شده و اولین تقسیم میوز را کامل می‌کند و با انجام لقاح دومین تقسیم میوز نیز کامل شده و اووسیت ثانویه تبدیل به اووتید (Ootid) و دومین جسم قطبی می‌گردد (۱۵). ظاهر سلولهای کومولوسی احاطه‌کننده اووسیت و اووپلاسم (Ooplasm)، نشانگر توانایی بلوغ اووسیت در شرایط آزمایشگاه است (۲۲). محیط بلوغ اووسیت و انتخاب پروتئینها و هورمونهای تکمیل‌کننده محیط، نقش بااهمیتی در لقاح و تکامل بعدی اووسیت خواهد داشت (۲۶).

اسپرمهای گاومیش قابلیت باروری پایینی داشته و چنانچه از منی‌های منجمد استفاده شود قدرت زنده‌ماندن آنها کاهش می‌یابد.

تغییر در پروتئینهای آکروزومی و صدمات وارده به غشاهای اسپرم در طی عمل انجماد اسپرمها مشاهده شده است (۲۵). اولین دام حاصل از به‌کارگیری روش IVF در نشخوارکنندگان، گوساله نری بود که در سال ۱۹۸۱ به دنیا آمد (۳) و تولد اولین گوساله گاومیش حاصل از IVF در سال ۱۹۹۱ گزارش شده است (۱۵).

بررسی حاضر شامل استحصال اووسیت‌ها از طریق تخمدانهای جمع‌آوری‌شده از کشتارگاه، بلوغ و لقاح اووسیت‌ها در محیط آزمایشگاه و تولید رویانهای قابل انتقال برای اولین بار در کشور می‌باشد.

مواد و روش کار

جمع‌آوری و بلوغ اووسیتها : تخمدانهای گاومیش از کشتارگاه ارومیه جمع‌آوری گردیده و در سرم فیزیولوژی حاوی ۱۰۰-۴۰۰IU پنی‌سیلین G سدیم (شرکت داروسازی جابربن حیان) در فلاسک مجهز به هیتر و در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد در عرض ۳-۲ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. عمل آسپیره‌کردن فولیکولهای با قطر ۸-۱ میلیمتر با استفاده از سرسوزن نمره ۱۸ و سرنگ استریل ۵ میلی‌لیتری یکبار مصرف انجام شد. مایع فولیکولی آسپیره‌شده در داخل پتری‌دیشهای استریل که حاوی یک میلی‌لیتر محیط Ham's F10 (شرکت GIBCO، اسکاتلند) که قبلاً با حرارت و گاز متعادل شده بود ریخته شدند.

در زیر استرومیکروسکوپ (Stereomicroscope)، توده‌های کومولوس-اووسیتی ("Cumulus-Oocyte Complex "COC) جداشده و ۳ مرتبه در محیط Ham's F10 حاوی ۱۰ درصد سرم گاومیش فحل ("Buffalo Estrus Serum "BES) شستشو داده شدند. با توجه به وضعیت ظاهری اووپلاسم و توده سلولهای کومولوسی پیرامون اووسیت آنها را به کیفیتهای خوب، متوسط، نامرغوب و دژنره تقسیم کرده (۵) و تنها اووسیت‌هایی که به‌وسیله سلولهای کومولوسی متراکم احاطه شده و سیتوپلاسم گرانوله داشتند، به‌منظور IVM مورد استفاده قرار گرفتند. اووسیت‌های باکیفیت خوب دارای سلولهای کومولوسی متراکم و انبوه (بیش از ۵ لایه سلول) و اووپلاسم یکنواخت بوده، اووسیت‌های باکیفیت متوسط دارای سلولهای کومولوسی متراکم ولی انبوه نبوده (تا ۵ لایه سلول) و اووسیت‌های نامرغوب شامل اووسیت‌های عریان می‌باشد. اووسیت‌های دژنره اووسیت‌هایی با سیتوپلاسم ناهمگون و سلولهای کومولوسی دژنره هستند (۲۲). پس از انتخاب اووسیت‌های قابل کشت (اووسیت‌های باکیفیت خوب و متوسط) آنها را مجدداً در محیط فوق شستشو داده و حدود ۱۰ عدد از آنها را در پتری‌دیش مخصوص که حاوی محیط کشت Ham's F10 همراه با ۱۰ درصد BES بود به‌مدت ۲۰ ساعت در حرارت ۳۹ درجه سانتیگراد در انکوباتور ۵ درصد CO_2 برای بلوغ کشت داده شدند.

آماده‌سازی اسپرم و لقاح آزمایشگاهی : برای تلقیح آزمایشگاهی از منی‌های تازه انزال شده که به‌وسیله واژن مصنوعی اخذ شده بود استفاده شد. روش به‌کار رفته برای قابلیت‌یابی‌کردن اسپرمها به شرح ذیل می‌باشد

نیم میلی‌لیتر منی را دوبار در محیط Ham's F10 حاوی ۰/۵ درصد سرم آلبومین گاو ("Bovine Serum Albumin "BSA) و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هپارین، (شرکت Leo، دانمارک) به‌وسیله سانتریفوژکردن (۷۵۰ دور در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه شستشو داده و پس از دورریختن مایع رویی، پلت حاصله را با استفاده از یک میلی‌لیتر محیط فوق مجدداً به‌صورت سوسپانسیون در آورده و برای کامل‌شدن قابلیت‌یابی و عمل شناورشدن (Swim-up) اسپرمها، نیم میلی‌لیتر از سوسپانسیون منی را در زیر یک میلی‌لیتر از محیط کشت ریخته و در انکوباتور به‌مدت ۳۰ دقیقه و با زاویه ۴۵ درجه قرار داده، بخش حاوی اسپرمهای متحرک برداشته شده و در زیر استرومیکروسکوپ تراکم و حرکت اسپرمها مورد ارزیابی قرار گرفت. مقداری از سوسپانسیون اسپرمها که معادل دو میلیون اسپرم در هر میلی‌لیتر می‌باشد را برداشته و به پتری‌دیشهایی که حاوی یک میلی‌لیتر محیط بلوغی (محیط کشت حاوی ۱۰ درصد BES) و ده عدد اووسیت بودند افزوده شد.

کشت رویانها : به‌منظور لقاح، اسپرمها و اووسیت‌ها به‌مدت ۶ ساعت در محیط کشت مجاور هم قرار گرفتند. پس از این مدت اووسیت‌ها را از اسپرمها جدا کرده، با محیط بلوغی شستشو داده شدند و به مدت چهار روز در محیط بلوغی در حرارت ۳۹ درجه سانتیگراد و ۵ درصد CO_2 کشت گردیدند. محیط کشت هر ۲۴ ساعت یکبار تعویض می‌گردید و پیشرفت رشد رویانها به‌طور روزانه در زیر استرومیکروسکوپ مورد ارزیابی قرار می‌گرفت.

۱) گروه آموزشی دامپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، لرستان - ایران.
۲) گروه آموزشی علوم پایه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه - ایران.

www.SID.ir

Archive of SID

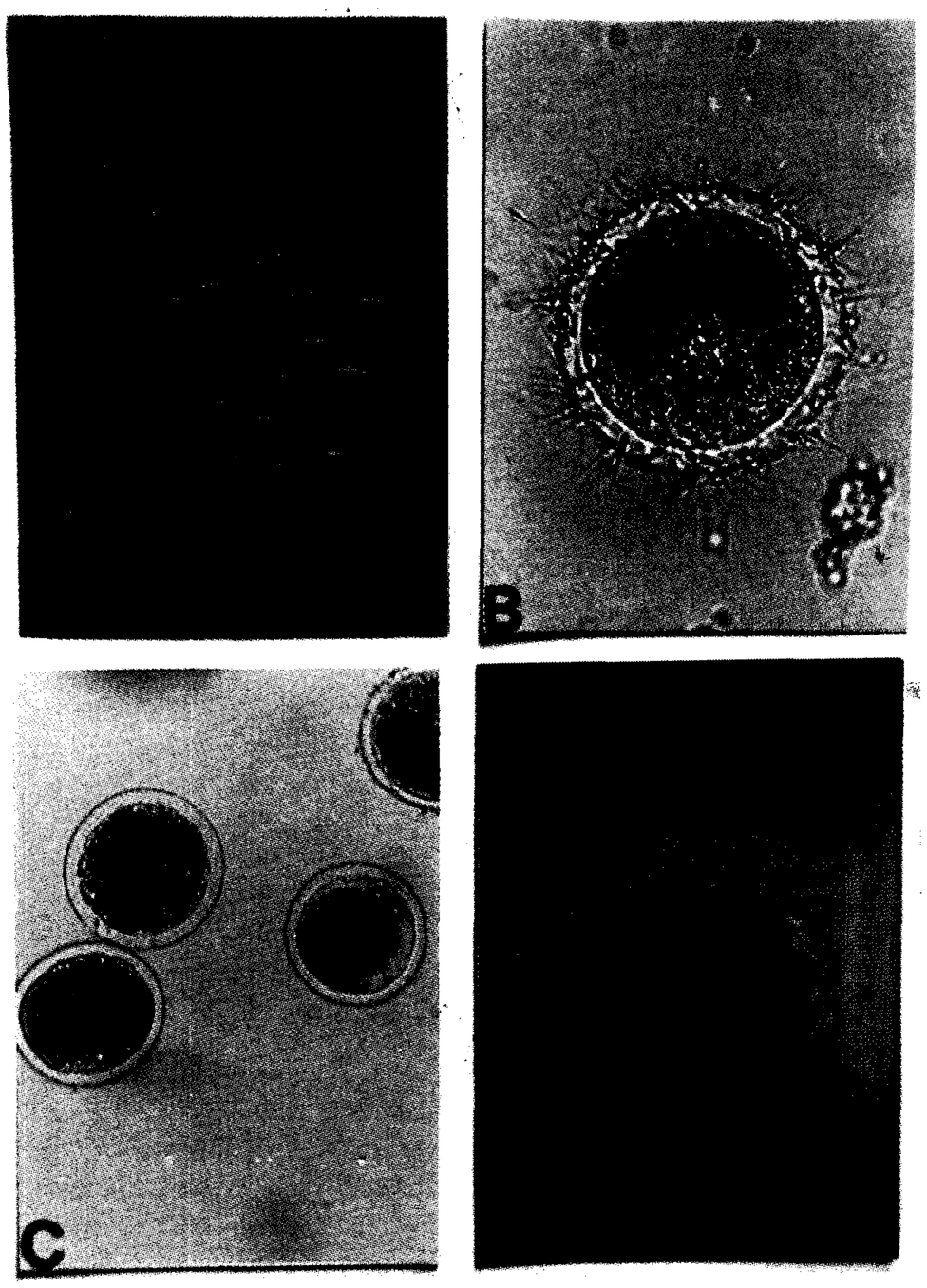
جدول ۱ – میزان بلوغ و لقاح اووسیت‌ها و رشد رویانها در محیط آزمایشگاه

تعداد اووسیت قابل کشت	اووسیت‌های بالغ‌شده (٪)	اووسیت‌های لقاح‌یافته (٪)	رویانهای شکافته‌شده (٪)	رویانهای دو سلولی (٪)	رویانهای چهار سلولی (٪)	مورولا (٪)
۱۰۳	۸۲(۷۹/۶)	۴۱(۵۰)	۱۳(۳۱/۷)	۳(۲۳)	۳(۲۳)	۷(۵۳/۸۴)

نتایج

در این بررسی مجموعاً ۱۳۰ عدد تخمدان گاومیش بالغ جهت استحصال اووسیت طی چندین تجربه از کشتارگاه جمع‌آوری شد و با استفاده از روش آسپیره‌کردن فولیکولهای تخمدانی ۲۷۰ عدد اووسیت به‌دست آمد (تصویر A-۱). از مجموع ۲۷۰عدد اووسیت‌های استحصال‌شده ۱۰۰عدد عریان بوده و ۴۵ عدد نیز دارای توده سلولهای کومولوسی نسبی بودند. تعداد اووسیت‌های با توده سلولهای کومولوسی متراکم و بیش از ۵ لایه سلولی، ۶۹عدد و اووسیت‌های دارای توده کومولوسی باز شده (Expand) و بین ۵-۲ لایه سلولی ۵۶عدد بودند و در مجموع ۸۹ عدد از فولیکولها حالت آترتیک نشان دادند.

با توجه به کیفیت اووسیت‌ها، درصد استحصال اووسیت‌های با کیفیت خوب، متوسط، نامرغوب و دژنره به‌ترتیب ۱۶، ۲۲، ۲۹ و ۳۳ درصد بودند. ۱۰۳ عدد از آنها جزء اووسیت‌های قابل کشت بوده و بقیه را اووسیت‌های عریان و آترتیک تشکیل می‌دادند. به‌دنبال کشت اووسیت‌ها، ۸۲ عدد از آنها علایم بلوغ را با خروج اولین جسم قطبی نشان دادند. به‌دنبال مجاورت اووسیت‌های بالغ‌شده با اسپرمهای قابلیت‌یابی شده (تصویر B-۱) ۵۰ درصد آنها لقاح یافتند (جدول ۱).



تصویر ۱ – A) اووسیت‌های عریان جداشده از تخمدانهای گاومیش، درشت‌نمایی ۲۵×، B) هجوم اسپرماتوزوئیدها در اطراف پرده شفاف اووسیت جهت نفوذ به داخل آن و انجام لقاح، درشت‌نمایی ۲۰۰×، C) اووسیت‌های لقاح‌یافته که مراحل مختلف تسهیم را نشان می‌دهند، درشت‌نمایی ۱۰۰×، D) مورولای گاومیش دارای بلاستومرهای یکسان، درشت‌نمایی ۲۰۰×

با پیشرفت رشد اووسیت‌های لقاح‌یافته، ۱۳ رویان در مراحل مختلف تکامل از دو سلولی تا مرولا به‌دست آمد (جدول ۱) که هفت رویان در مرحله مرولا بودند (تصویر D و C-۱).

بحث

در رابطه با استحصال اووسیت آزمایشگاههای مختلف با توجه به روش استحصال میزان متفاوتی گزارش نموده‌اند. میزان حصول اووسیت به ازاء هر تخمدان گاو را بین ۷/۵۴(۸) تا ۶۳/۳(۱۲) گزارش کرده‌اند و علت تفاوت زیاد در ارقام فوق به‌علت روشهای به‌کار رفته در جمع‌آوری اووسیت می‌باشد. به‌نحوی که با استفاده از روش برشهای نازک (Slicing) سه برابر بیشتر از روش آسپیره‌کردن اووسیت به‌دست می‌آید (۱۲). میزان استحصال اووسیت به ازاء هر تخمدان گاومیش را بین ۰/۷۳(۲۴) تا ۱/۷(۵) عدد گزارش نموده‌اند. در بررسی حاضر که از روش آسپیره‌کردن فولیکولها استفاده گردید میزان اووسیت به‌دست آمده به ازاء هر تخمدان ۲/۰۷ عدد بود. علت پایین‌بودن میزان استحصال اووسیت به روش آسپیره‌کردن در مقایسه با روش برشهای نازک این است که در روش اخیر علاوه‌بر فولیکولهای سطحی از فولیکولهای عمقی کوچکتر با قطر کمتر از ۲ میلیمتر نیز اووسیت به‌دست می‌آید (۱۲).

در یک بررسی میزان استحصال اووسیت قابل کشت در گاومیش با استفاده از روش آسپیره‌کردن ۲۶/۵ درصد گزارش شده است (۲۲).

اووسیت‌هایی قابل کشت هستند که دارای کیفیت خوب و متوسط باشند (۲۰). در بررسی حاضر اووسیت‌های قابل کشت ۳۸ درصد کل اووسیت‌های استحصال‌شده را شامل شدند.

در گاو قابلیت بلوغ اووسیت بستگی به فعالیت تخمدان، رشد فولیکولی و سلولهای کومولوسی دارد و اووسیت‌هایی که از فولیکولهای بزرگتر به‌دست آمده‌اند، نسبت به آنهایی که از فولیکولهای کوچکتر حاصل شده‌اند سریعتر به مرحله بلوغ می‌رسند و اغلب اووسیت‌های حاصل از فولیکولهای با قطر ۵-۳ میلیمتر در مرحله (Germinal Vesicle "GV") می‌باشند (۱۵).

در بررسی حاضر محیط بلوغی با افزودن ۱۰ درصد BES تکمیل شده بود. در گزارشات دیگری از این روش برای بلوغ اووسیت‌های گاو استفاده شده است. زیرا سرم خون فاکتورهای متعددی از جمله پروتئینها، اسیدهای چرب، ویتامینها، عناصر کمیاب، هورمونها و عوامل رشد را در خود دارد و احتمالاً یکی از ترکیبات ناشناخته سرم عامل رشد اپیدرمی (Epidermal Growth Factor "EGF") است که باعث افزایش بلوغ اووسیت می‌گردد (۱۳). سرم حیوانات فحل، قابلیت تکاملی اووسیت‌های IVM شده و میزان لقاح را افزایش می‌دهد و چنانچه از محیط حاوی سرم به‌منظور کشت اووسیت‌ها استفاده شود توقف رشدی مشاهده نمی‌شود (۱۵). به‌منظور تهیه سرم دامهای فحل، باید از دامهایی با پیشینه بهداشتی مشخص خونگیری به‌عمل آید تا خطر انتقال بیماریهای مسری مانند سل، بروسلوز، IBR، BVD و ... به محیط کشت و رویان کاهش یابد. خون این دامها جهت تهیه سرم در مرحله خاصی از چرخه جنسی یعنی در مرحله فحلی ایستایی (Standing heat) جمع‌آوری گردیده و دقت لازم به‌عمل آید تا همولیز صورت نگیرد (۱۷). به‌منظور غیرفعال‌نمودن ویروسهای احتمالی موجود در سرم، باید سرم را به‌مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۵۶ درجه سانتیگراد غیرفعال نمود (۲۶ و ۱۹).

امروزه استفاده از محیط کشت TCM199 همراه با سرم دام فحل در

www.SID.ir

Archive of SID

فرآیند IVF و IVMگاومیش مناسبتر تشخیص داده شد (۹) و در این بررسی نیز از محیط Ham's F10 استفاده گردید. در یک ارزیابی مقایسه‌ای که در مورد افزودن چهار نوع سرم شامل : سرم گاو فحل، گاومیش فحل، سرم پرواستروس و پست‌استروس گاومیش به محیط بلوغی اووسیت‌های گاومیش انجام گردید مشخص شد که سرم جمع‌آوری‌شده در مرحله استروس و پرواستروس دارای تأثیر بهتری می‌باشند ولی بهترین سرم جهت افزودن به محیط بلوغی اووسیت در گاومیش سرم دام فحل می‌باشد (۱۸). گزارش شده است که با استفاده از سرم فوق نیازی به افزودن هورمونهای دیگری به محیط کشت نیست (۲۲ و ۱۵). با افزودن BSA به محیط Ham's F10 میزان بلوغ اووسیت‌های گاومیش ۳۱/۸ درصد بوده ولی با افزودن BES این میزان به ۵۶/۸ درصد افزایش یافته است.

با توجه به نقش مهم حیوان نر در لقاح و مراحل بعدی رشد ساده‌ترین و مؤثرترین راه استفاده از منی یک دام در فرآیند IVF می‌باشد (۱۷).

میانگین تعداد اسپرم در هر انزال گاو سه میلیارد عدد گزارش گردیده (۲) و در بررسی حاضر این تعداد در هر انزال گاومیش چهار میلیارد محاسبه گردید. حجم منی گاومیش رودخانه‌ای بندرت از ۴ میلی‌لیتر بیشتر می‌شود (۱۱) و در بررسی حاضر میانگین حجم منی ۴/۱ میلی‌لیتر بود. استفاده از منی تازه نسبت به منی منجمد در IVF دامها نتایج بهتری به‌دنبال دارد (۱۵). میزان لقاح با اسپرمهای حاصل از منی تازه در گاومیش ۷۷/۱ درصد و با منی منجمد ۲۳/۳ درصد گزارش شده است (۲۴). بهترین غلظت اسپرم گاومیش جهت IVF دو میلیون اسپرم در میلی‌لیتر بوده و بهترین غلظت هپارین برای قابلیت‌یابی اسپرمهای گاومیش ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر می‌باشد (۲۵). در بررسی حاضر نیز غلظتهای فوق رعایت گردید. استفاده از میزان اسپرم کمتر از غلظت مورد نیاز باعث کاهش درصد باروری و استفاده بیشتر از میزان لازم نیز پلی‌اسپرمی را به‌دنبال دارد (۲۵).

درجه حرارت انتقال تخمدانهای گاو از کشتارگاه به آزمایشگاه عمدتاً ۳۷-۳۲ درجه سانتیگراد می‌باشد و زمان بین جمع‌آوری تخمدان گاومیشها و انتقال به آزمایشگاه نیز بین ۳-۲ ساعت می‌باشد (۷) و در طی انتقال درجه حرارت تقریباً ثابت بود. در یک تحقیق زمان بین کشتار گاومیشها و حصول اووسیت ۴-۳ ساعت گزارش شده است (۲۱).

میزان بلوغ اووسیت‌های گاو در آزمایشگاه از ۵۵ تا ۸۳ درصد (۱۳) در محیطهای مختلف گزارش گردیده است ولی به‌طور کلی در غالب آزمایشگاهها میزان بلوغ ۸۰ درصد می‌باشد (۱۰). میزان IVM در گاومیش از ۶۷/۵۲ درصد تا ۸۲/۰۸ درصد گزارش شده است (۱۸ و ۱۵). در تحقیق حاضر، با در نظرگرفتن اووسیت‌های قابل کشت، میزان IVM برابر با ۷۹/۶ درصد بود که تقریباً نزدیک به حداکثر مقدار گزارش شده است.

مدت زمان لازم برای بلوغ اووسیت در گاومیش ۲۴-۲۲ ساعت (۲۶، ۲۴، ۱۶، ۱۵، ۴) و درجه حرارت نیز ۳۹ درجه سانتیگراد (۲۷، ۲۶، ۲۴) یا ۳۸/۵ درجه سانتیگراد (۴) در انکوباتور حاوی ۰/۵ CO_2 می‌باشد. مدت زمان IVM در بررسی حاضر ۲۰ ساعت و درجه حرارت نیز ۳۹ درجه سانتیگراد بود. میزان لقاح اووسیت‌های بالغ‌شده در گاو ۷۰ درصد (۱۰) و در گاومیش ۵۵-۲۲ درصد (۱۸ و ۱۵) گزارش شده است. در بررسی حاضر میزان لقاح اووسیت‌های بالغ‌شده ۵۰ درصد بود. میزان تسهیم اووسیت‌های لقاح‌یافته گاومیش در یک تحقیق ۳۹/۲ درصد (۲۸) و در تحقیق دیگری با توجه به کیفیت اووسیت‌های لقاح‌یافته شامل خوب، متوسط و نامرغوب، به‌ترتیب ۶۷/۳ درصد، ۲۷/۵ درصد و ۳ درصد گزارش شده است و رویانهای قابل انتقال حاصل از این اووسیت‌های تسهیم‌یافته نیز به‌ترتیب ۱۸/۴ درصد، ۵/۵ درصد و صفر بوده است (۲۲). در بررسی حاضر میزان تسهیم ۳۱/۷ درصد اووسیت‌های لقاح‌یافته بود و از این تعداد نیز ۵۳/۸۴ درصد تا مرحله مورولا رشد کردند (جدول ۱).

در گاومیش هنگامی که رویان وارد شاخ رحم می‌شود در مرحله مورولا (۶) و پنج روز پس از تلقیح، مورولا از شاخ رحم به‌وسیله فلاشینگ به‌دست آمده است (۲۳ و ۶). در بررسی حاضر در ۸۵ ساعت پس از تلقیح، رویانهای تسهیم‌یافته در مرحله مورولا مشاهده گردید. در گزارشی، رویانهای ۱۶-۸ سلول گاومیش در ۸۵ ساعت پس از تلقیح به‌وسیله فلاشینگ به‌دست آمده است (۱).

محدودیتهای زیادی در IVFگاومیش وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به پایین‌بودن اووسیت‌های قابل استفاده، آترزی زیاد فولیکولها، میزان لقاح پایین در مقایسه با گاو، تأثیرات فصلی بر روی رشد فولیکول و کیفیت اووسیت‌ها و تأثیر فصل بر کیفیت منی اشاره نمود (۲۴) و احتمالاً به‌دلایل فوق است که تا سال ۱۹۹۸ فقط تولد ۷ رأس گوساله گاومیش رودخانه‌ای حاصل از IVF را در جهان گزارش نموده‌اند (۱۵ و ۴).

References

1. Anwar, M. and Ullah, N. Early development and location of embryos in the reproductive tract of Nilli Ravi buffalo (Bubalis bubalis): Areteospective analysis. Theriogenology, 49: 1187-1193, (1998).
2. Austin, C.R. and Short, R.V. Reproduction in mammals: 1. Germ cells and fertilization. 2nd Ed. Cambridgr university press. USA, PP: 128-163, (1987).
3. Brackett, B.G., Bousguet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. and Dressel, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol. Reprod., 27: 147-158, (1982).
4. Chauhan, M.S., Katiyar, P.K., Mangla, S.K., Manik, R.S. and Madan, M.L. Production of buffalo calves through in vitro fertilization. Ind. J. Anim. Sci. 67: 306-308, (1997).
5. Das, G.K., Jain, G.C., Solanki, V.S. and Tripathi, V.N. Efficacy of various collection methods for oocyte retrival in buffalo. Theriogenology, 46: 1403-1411, (1996).
6. Drost, M. and Elsden, R.P. Blastocyst development in the water buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology, 23: 197 (abstr), (1985).
7. Feng, H.L., Yang, Q.Z., Sun, Y., Qin, P.C. and Liu, J.M. Development of raely embryos in different culture system. Vet. Rec. 135: 304-306, (1994).
8. Fry, R.C., Niall, E.M., Simpson, T.L., Sguires, T.J. and Reynolds, J. The collection of oocytes from bovine ovaries. Theriogenology, 47: 977-987, (1997).
9. Gordon, I. and Lu, K.H. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogenology, 33: 77-87, (1990).
10. Greve, T., Madison, V., Avery, B., Callesen, H. and Hyttel, P. In vitro production of bovine embryos: A prort. report and conceguences on the genetic upgrading of cattle population. Anim. Repord. Sci., 33: 51-69, (1993).
11. Hafez, E.S.E. Reproduction in farm animals. 6th Ed. Lea & Febiger, Philadelphia. USA, PP: 315-329, (1993).
12. Hamano, S. and Kuwayama, M. In vitro fertilization and

www.SID.ir

Archive of SID

development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. Theriogenology, 39: 703-712, (1993).

13. Kim, C.I., Ellington, J.E. and Foote, R.H. Maturation, fertilization and development of boyine oocyte in vitro using TCM199 and a simple defined medium with co-culture. Theriogenology, 33: 433-440, (1990).

14. Leibfried, L. and First. N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. J. Anim. Sci., 48:76-86, (1979).

15. Madan, M.L., Singla, S.K., Jailkani, S. and Ambrose, J.D. In vitro fertilization in buffaloes and birth of first ever IVF buffalo calf. Post cong post cong proc 3rd world buffalo. Bulgaria, 7: 11-17, (1991).

16. Madan, M.L., Singla, S.K., Chauhan, M.B. and Manik, R.S. In vitro production and transfer of embryos. Theriogenology, 41: 139-143, (1994).

17. Marguant Leguienne, B. and Humblot, P. Pratical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. Theriogenology, 49: 3-11, (1998).

18. Samad, H.A., Gadeer, I., Rehman, N. and Ahmad, N. The recovery, In vitro maturation and fertilization of Nilli Ravi buffalo follicular oocytes. J. Reprod. Fertil. 20: 21 (abstr), (1997).

19. Sanbuissho, A. and Threfall, W.R. The effect of estrous cow serum on the in vitro maluration and fertilization of the bovine follicular oocyte. Theriogenology, 37: 693-699, (1989).

20. Selvaraj, R., Majumdar, A.C. and Ansar, M.R. Quality of oocytes from different size follicles of buffalo ovaries obtained from slaughterhouse. Ind. J. Anim. Sci., 62: 434-435, (1992).

21. Sing, R. and Majumdar, A.C. Chronological change of buffalo follicular oocytes maturation in vitro. Ind. J. Anim. Sci., 62: 205-209, (1992).

22. Suzuli, T., Singla, S.K., Sujata, J. and Madan, M.L. Cleavage capability of water buffalo follicular oocytes classified by cumulus cells and fertilized in vitro. J. Vet. Med. Sci. 53: 475-478, (1991).

23. Taneja, M., Totey, S.M. and Singh, G. Attempt to produce monozygotic twins of buffalo by transfer of demi-embryos without zona Pellucidae. Buffalo, J. 2: 135-141, (1993).

24. Totey, S.M., Singh, G., Taneja, M., Pawshe, C.H. and Talwar, G.P. In vitro maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo *(Bubalusbubalis)*. Reprod. Fet., 95: 597-607, (1992).

25. Totey, S.M., Pawshe, C.H. and Singh, G.P. Effects of bull and heparin and sperm concentration on in vitro fertilization of buffalo *(Bubalus bubalis)*: oocytes matured in vitro. Theriogenology, 39: 887-898, (1993).

26. Totey, S.M., Pawshe, C.H. and Singh, G.P. Effects of bull and heparin and sperm concentration on in vitro fertilization of buffalo *(Bubalus bubalis)*: effects of media. Hormones and sera. Theriogenology, 39: 1153-1171, (1993).

27. Totey, S.M., Daliri, M., Apo Rao, K.B.C., Pawshe, C.H., Taneja, M. and Chillar, R.S. Differential cleavage and developmental rates and their correlation with cell numbers and sex ratios in buffalo embryos generated in vitro. Theriogenology, 45: 521-533, (1996).

In vitro fertilization and early embryonic development in buffalo

Abbasi, M.[1], Sadrekhanloo, R.A.[2]

[1]*Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan - Iran.* [2]*Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia - Iran.*

IVF is one of the important techniques for the production of the animals with high genetic values. In this study, the oocytes were recovered from the buffalo ovaries which were slaughtered at Urmia abattoir, and based on the cumulus cell characteristics, they were classified into four. Groups of oocyts with good and fair qualities, were cultured in Ham's F10 culture medium supplemented with 10% BES, and incubated in 39°C temprature and 5% CO_2 in air. Following 20hr of IVM, the oocyts were fertilized by capacitated sperms. The fertilized oocytes were further cultured up to four days. The result of this study revealed that 79.6% of oocytes matured and 37.7% of the fertilized oocytes were reached to early cleavage stage.

Key words : Buffalo, Oocyte, Maturation, Fertilization, Culture.

www.SID.ir