

## لقاح آزمایشگاهی و مراحل اولیه رشد رویان در گاو میش

دکتر محسن عباسی<sup>۱</sup> دکتر رجبعلی صدرخانلو<sup>۲</sup>

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

سرنگ استریل ۵ میلی لیتری یکبار مصرف انجام شد. مایع فولیکولی آسپیره شده در داخل پتری دیشهای استریل که حاوی یک میلی لیتر 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 ("COC" Cumulus-Oocyte Complex) جدا شده و ۳ مرتبه در محیط Ham's F10 حاوی ۱۰ درصد سرم گاو میش فصل ("BES" Buffalo Estrus Serum) شستشو داده شدند. با توجه به وضعیت ظاهری اوویلاسم و توده سلولهای کومولوسی پیرامون اووسیت آنها را به کیفیتهای خوب، متوسط، نامرغوب و دژنره تقسیم کرده (۵) و تنها اووسیت‌هایی که به وسیله سلولهای کومولوسی متراکم احاطه شده و سیتوپلاسم گرانوله داشتند، به منظور IVM مورد استفاده قرار گرفتند. اووسیت‌های با کیفیت خوب دارای سلولهای کومولوسی متراکم و انبوه (بیش از ۵ لایه سلول) و اوویلاسم یکنواخت بوده، اووسیت‌های با کیفیت متوسط دارای سلولهای کومولوسی متراکم ولی انبوه نبوده (تا ۵ لایه سلول) و اووسیت‌های نامرغوب شامل اووسیت‌های عربیان می‌باشد. اووسیت‌های دژنره اووسیت‌هایی با سیتوپلاسم ناهمگون و سلولهای کومولوسی دژنره هستند (۲۲). پس از انتخاب اووسیت‌های قابل کشت (اووسیت‌های با کیفیت خوب و متوسط) آنها را مجدداً در محیط فوق شستشو داده و حدود ۱۰ عدد از آنها را در پتری دیش مخصوص که حاوی محیط کشت Ham's F10 همراه با ۱۰ درصد BES بود به مدت ۲۰ ساعت در حرارت ۳۹ درجه سانتیگراد در انکوباتور ۵ درصد CO<sub>2</sub> برای بلوغ کشت داده شدند.

**آماده‌سازی اسپرم و لقاح آزمایشگاهی:** برای تلقیح آزمایشگاهی از منی‌های تازه انزال شده که به وسیله واژن مصنوعی اخذ شده بود استفاده شد. روش به کار رفته برای قابلیت‌یابی کردن اسپرمها به شرح ذیل می‌باشد

نیم میلی لیتر منی را دوبار در محیط Ham's F10 حاوی ۰/۵ درصد سرم آلبومین گاو ("BSA" Bovine Serum Albumin) و ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر هپارین، (شرکت Leo، دانمارک) به وسیله سانتریفیوژ کردن (۷۵۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه شستشو داده و پس از دور ریختن مایع رویی، پلت حاصله را با استفاده از یک میلی لیتر محیط فوق مجدداً به صورت سوسپانسیون در آورده و برای کامل شدن قابلیت‌یابی و عمل شناور شدن (Swim-up) اسپرمها، نیم میلی لیتر از سوسپانسیون منی را در زیر یک میلی لیتر از محیط کشت ریخته و در انکوباتور به مدت 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 میلی لیتر می‌باشد را برداشته و به پتری دیشهایی که حاوی یک میلی لیتر محیط بلوغی (محیط کشت حاوی ۱۰ درصد BES) و ده عدد اووسیت بودند افزوده شد.

**کشت رویانها:** به منظور لقاح، اسپرمها و اووسیت‌ها به مدت 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<sub>2</sub> کشت گردیدند. محیط کشت هر ۲۴ ساعت یکبار تعویض می‌گردید و پیشرفت رشد رویانها به‌طور روزانه در زیر استرومیکروسکوپ مورد ارزیابی قرار می‌گرفت.

لقاح آزمایشگاهی یکی از روشهای عمده جهت تولید دامهای با ارزش ژنتیکی برتر می‌باشد. در بررسی حاضر به منظور انجام فرآیند لقاح آزمایشگاهی از تخمدان گاو میشهای کشتار شده 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 گاو میش فصل تکمیل شده بود، در حرارت ۳۹ درجه سانتیگراد در انکوباتور با ۵ درصد گاز دی‌اکسید کربن کشت شدند. پس از طی ۲۰ ساعت از کشت، اووسیت‌ها با استفاده از اسپرمهای قابلیت‌یابی شده لقاح یافتند. به منظور پیشرفت مراحل اولیه رشد، اووسیت‌های لقاح یافته به محیطهای تازه انتقال داده شدند. نتایج نشان داد که ۷۹/۶ درصد اووسیت‌های قابل کشت، بالغ شده و ۳۱/۷ درصد اووسیت‌های لقاح یافته، تسهیم یافتند. **واژه‌های کلیدی:** گاو میش، اووسیت، بلوغ، لقاح، کشت.

در سالهای اخیر تکنیک لقاح آزمایشگاهی ("IVF" In Vitro Fertilization) به‌طور رایج و موفقیت‌آمیز در تولید دامهای اهلی به کار می‌رود و در این فرآیند از اووسیت‌های (Oocyte) حاصل از تخمدانهای جمع‌آوری شده 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 آزاد شدن 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 اوویلاسم (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 گاو میش قابلیت باروری پایینی داشته و چنانچه از منی‌های منجمد استفاده شود قدرت زنده ماندن 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 گاو میش حاصل از IVF در سال ۱۹۹۱ گزارش شده است (۱۵).

بررسی حاضر شامل استحصال اووسیت‌ها از طریق تخمدانهای جمع‌آوری شده 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 گاو میش از کشتارگاه ارومیه جمع‌آوری گردیده و در سرم فیزیولوژی حاوی ۱۰۰-۴۰۰ IU پنی‌سیلین G سدیم (شرکت داروسازی جابربن حیان) در فلاسک مجهز به هیتر و در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد در عرض ۲-۳ ساعت به آزمایشگاه انتقال داده شدند. عمل آسپیره کردن فولیکولهای با قطر ۸-۱ میلی‌متر با استفاده از سرسوزن نمره ۱۸ و

۱) گروه آموزشی دامپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، لرستان - ایران.

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



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

تعداد اووسیت قابل کشت	اووسیت‌های بالغ‌شده (%)	اووسیت‌های لقاح‌یافته (%)	رویانه‌های شکافته‌شده (%)	رویانه‌های دو سلولی (%)	رویانه‌های 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 آسپیره کردن فولیکولهای تخمدانی ۲۷۰ عدد اووسیت به‌دست آمد (تصویر A-1). از مجموع ۲۷۰ عدد اووسیت‌های استحصال شده ۱۰۰ عدد 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، ۶۹ عدد و اووسیت‌های دارای توده کومولوسی باز شده (Expand) و بین ۵-۲ لایه سلولی ۵۶ عدد 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 به ترتیب 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 علائم بلوغ را با خروج اولین جسم قطبی نشان دادند. به‌دنبال مجاورت اووسیت‌های بالغ‌شده با اسپرم‌های قابلیت‌یابی شده (تصویر B-1) ۵۰ درصد آنها لقاح یافتند (جدول ۱).

با پیشرفت رشد اووسیت‌های لقاح‌یافته، ۱۳ رویان در مراحل مختلف تکامل از دو سلولی تا مورولا به‌دست آمد (جدول ۱) که هفت رویان در مرحله مورولا بودند (تصویر D و C-1).

### 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 آسپیره کردن اووسیت به‌دست می‌آید (۱۲). میزان استحصال اووسیت به ازاء هر تخمدان گاومیش را بین ۷/۳ (۲۴) تا ۱/۷ (۵) عدد گزارش نموده‌اند. در بررسی حاضر که از روش آسپیره کردن فولیکولها استفاده گردید میزان اووسیت به‌دست آمده به ازاء هر تخمدان ۲/۷ عدد بود. علت پایین بودن میزان استحصال اووسیت به روش آسپیره کردن در مقایسه با روش برشهای نازک این است که در روش اخیر علاوه بر فولیکولهای سطحی از فولیکولهای عمقی کوچکتر با قطر کمتر از ۲ میلی‌متر نیز اووسیت به‌دست می‌آید (۱۲).

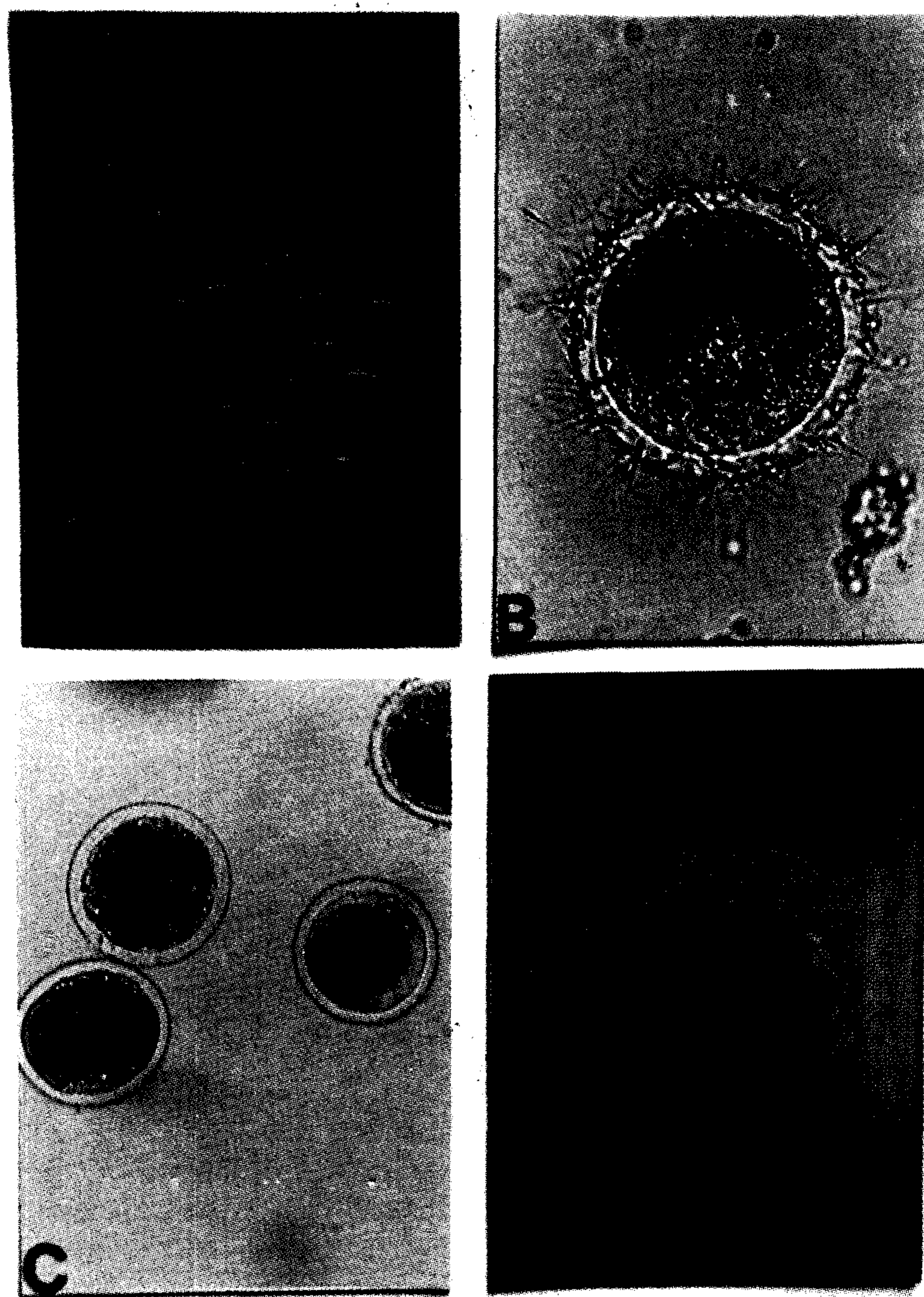
در یک بررسی میزان استحصال اووسیت قابل کشت در گاومیش با استفاده از روش آسپیره کردن ۲۶/۵ درصد گزارش شده است (۲۲).

اووسیت‌هایی قابل کشت هستند که دارای کیفیت خوب و متوسط باشند (۲۰). در بررسی حاضر اووسیت‌های قابل کشت ۳۸ درصد کل اووسیت‌های استحصال شده 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 آنهايي که از فولیکولهای کوچکتر حاصل شده‌اند سریعتر به مرحله بلوغ می‌رسند و اغلب اووسیت‌های حاصل از فولیکولهای با قطر ۳-۵ 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 ("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 غیرفعال نمودن 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



تصویر ۱ - A) اووسیت‌های عریان جدا شده 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×



و پنج روز پس از تلقیح، مورولا از شاخ رحم به وسیله فلاشینگ به دست آمده است (۲۳ و ۶). در بررسی حاضر در ۸۵ ساعت پس از تلقیح، رویانهای تسهیم یافته در مرحله مورولا مشاهده گردید. در گزارشی، رویانهای ۱۶-۸ سلول گاو میش در ۸۵ ساعت پس از تلقیح به وسیله فلاشینگ به دست آمده است (۱).

محدودیت‌های زیادی در IVF گاو میش وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به پایین بودن 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 به دلایل فوق است که تا سال ۱۹۹۸ فقط تولد ۷ رأس گوساله گاو میش 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. Cambridge university press. USA, PP: 128-163, (1987).
3. Brackett, B.G., Bousquet, 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 retrieval in buffalo. *Theriogenology*, 46: 1403-1411, (1996).
6. Drost, M. and Elsdén, 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 raelly embryos in different culture system. *Vet. Rec.* 135: 304-306, (1994).
8. Fry, R.C., Niall, E.M., Simpson, T.L., Squires, 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

فرآیند IVF و IVM گاو میش 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، گاو میش فحل، سرم پرواستروس و پست‌استروس گاو میش به محیط بلوغی اووسیت‌های گاو میش انجام گردید مشخص شد که سرم جمع‌آوری شده در مرحله استروس و پرواستروس دارای تأثیر بهتری می‌باشند ولی بهترین سرم جهت افزودن به محیط بلوغی اووسیت در گاو میش 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 گاو میش 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 گاو میش چهار میلیارد محاسبه گردید. حجم منی گاو میش 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 به دنبال دارد (۱۵). میزان لقاح با اسپرمهای حاصل از منی تازه در گاو میش ۷۷/۱ درصد و با منی منجمد ۲۳/۳ درصد گزارش شده است (۲۴). بهترین غلظت اسپرم گاو میش جهت IVF دو میلیون اسپرم در میلی‌لیتر بوده و بهترین غلظت هپارین برای قابلیت یابی اسپرمهای گاو میش 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 به دنبال دارد (۲۵).

درجه حرارت انتقال تخمدانهای گاو از کشتارگاه به آزمایشگاه عمدتاً ۳۲-۳۷ درجه سانتیگراد می‌باشد و زمان بین جمع‌آوری تخمدان گاو میشها و انتقال به آزمایشگاه نیز بین ۲-۳ ساعت می‌باشد (۷) و در طی انتقال درجه حرارت تقریباً ثابت بود. در یک تحقیق زمان بین کشتار گاو میشها و حصول اووسیت ۳-۴ 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 گاو میش از ۶۷/۵۲ درصد تا ۸۲/۰۸ درصد گزارش شده است (۱۵ و ۱۸). در تحقیق حاضر، با در نظر گرفتن 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 گاو میش ۲۲-۲۴ 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 ۵/۵ CO<sub>2</sub> می‌باشد. مدت زمان IVM در بررسی حاضر ۲۰ ساعت و درجه حرارت نیز ۳۹ درجه سانتیگراد بود. میزان لقاح اووسیت‌های بالغ شده در گاو ۷۰ درصد (۱۰) و در گاو میش ۲۲-۵۵ درصد (۱۵ و ۱۸) گزارش شده است. در بررسی حاضر میزان لقاح اووسیت‌های بالغ شده ۵۰ درصد بود. میزان تسهیم اووسیت‌های لقاح یافته گاو میش در یک تحقیق ۳۹/۲ درصد (۲۸) و در تحقیق دیگری با توجه به کیفیت اووسیت‌های لقاح یافته شامل خوب، متوسط و نامرغوب، به ترتیب ۶۷/۳ درصد، ۲۷/۵ درصد و ۳ درصد گزارش شده است و رویانهای قابل انتقال حاصل از این اووسیت‌های تسهیم یافته نیز به ترتیب ۱۸/۴ درصد، ۵/۵ درصد و صفر بوده است (۲۲). در بررسی حاضر میزان تسهیم ۳۱/۷ درصد اووسیت‌های لقاح یافته بود و از این تعداد نیز ۵۳/۸۴ درصد تا مرحله مورولا رشد کردند (جدول ۱).

در گاو میش هنگامی که رویان وارد شاخ رحم می‌شود در مرحله مورولا (۶)



- 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 bovine 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., Jaikani, 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. Practical 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 maturation 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 (*Bubalus bubalis*). *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.<sup>1</sup>, Sadrekhanloo, R.A.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Lorestan - Iran.* <sup>2</sup>*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 oocytes with good and fair qualities, were cultured in Ham's F10 culture medium supplemented with 10% BES, and incubated in 39°C temperature and 5% CO<sub>2</sub> in air. Following 20hr of IVM, the oocytes 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.

