The predictable of follicle and oocyte diameter through some overian and oocyte traits in local ewes

التنبؤ بقطر الجريبة والبويضة من خلال بعض صفات المبيض والبويضة في النعاج المحلية

د. هاشم مهدي الربيعي * د. جميل سرحان اللامي* علي جاسم جعفر كاظم النعيمي*
جامعة الفرات الأوسط التقنية / الكلية التقنية - المسيب
*** جامعة كربلاء - كلية الطب البيطري**
Drhashem48@yahoo.com

بحث مستل من الباحث الثالث (رسالة ماجستير).

المستخلص

اجريت الدراسة في مختبرات قسم تقنيات الانتاج الحيواني / الكلية التقنية / المسيب للمدة من أيلول 2008 لغاية حزيران 2009 بهدف التنبؤ بقطر الجريبة والبويضة من خلال بعض صفات المبيض والبويضة في النعاج المحلية. جُمعت المبايض (300 مبيض) من 150 نعجة بالغة غير حامل تتراوح أعمارها 3-5 سنوات والتي ذُبحت في مجازر قضاء المسيب. نُقلت المبايض إلى المختبر ساعة واحدة. سُحب السائل الجريبي من الجريبات لغرض استحصال البويضات وتقويمها. بينت النتائج أن أعلى نسبة للبويضات الناضجة عندما يكون قطر الجريبة مابين 2-3 ملم وقطر البويضة بمعدل 115-120 مايكروميتر.أ{تفعت معنوياً ($p<0.05$) نسبة الجريبات الواقعة على المبيض الايسر ، بينما لم يسجل هذا التأثير على قطر الجريبات. ازداد معنوياً ($p<0.05$) قطر بويضات المبيض الايسر عن الايمن. اظهرت النتائج أيضاً أزدياد قطر البويضة مع زيادة سمك النطاق الشفاف وعدد الجريبات. كان معامل الأرتباط موجباً ومعنوياً بين قطر الجريبة والبويضة ، في حين كان سالباً بين كل من قطر الجريبة ونضجها وكذلك بين قطر البويضة ونضجها .

مفاتيح الكلمات: قطر الجريبة ، قطر البويضة ، النعاج المحلية

Abstract :

The study was conducted at department of animal technical production, Al-Musaib Technical college from September 2008 to July 2009 to investigate the predictable of follicle and oocyte diameter through some overian and oocyte traits in local ewes. The ovaries were collected (300 ovaries) from (150) non-pregnant adult ewes (3-5 years.old) slaughtered at abattoir of Al-Musaib provine. The ovaries were transported to the laboratory within one hours post slaughter. Follicular fluid were aspirated from follicles for recovery and evaluation of oocytes. The results showed that presence of highest percentage of mature oocytes when the follicular diameter was between 2-3 mm and oocytes diameter ranged from 115-120 microns. Significant higher ($p<0.01$) in presence of percentage of follicles on left ovary, while there were no significant differences on the follicular diameter. Significantly increased($p<0.05$) in oocytes diameter of left from the right ovary. The results showed also that the oocytes diameter increased with the increased thickness of zona pellucida a number of follicles. A significant positive correlation coefficient was found between follicular and oocyte diameter while the correlation coefficient was significantly negative between diameter and its maturation and between oocyte diameter and its maturation.

Key words: follicular diameter , oocyte diameter, local ewes

المقدمة

تُعد البويضات التي يتم الحصول عليها من المجازر مصدرا رخيصا مهما لإنتاج الأجنة لأبحاث التطور الحياتي والوظيفي والتقانات الحياتية مثل تجميد البويضات (1) والأجنة (2) ونقل النواة (3). إن بويضات النعاج المنضجة باستخدام التقانات المختبرية بالإمكان أن تؤدي دورا بالتحسين الوراثي وبشكل يساعد على رفع إنتاجية الأغنام (4) ، اذ تنمو وتنضج البويضة بأجواء أو ظروف كيموحيوية مرتبطة بتغيير حجم الجريبة من صغيرة إلى كبيرة، وان الايض الايوني والصفات الإنزيمية للسائل الجريبي وتطور الجريبة او البويضة كلها تكون ذات علاقة قوية بنضج البويضة (5)، وكما أوضحت دراسة اخرى وجود علاقة مهمة بين حجم الجريبة وحجم السائل الجريبي (6)، تعد البويضات المستحصلة من الجريبات الكبيرة ذات نمو وتطور عال متكامل (7) يحصل التكامل التطوري للبويضات مع زيادة حجم الجريبات فيلاحظ التكامل التطوري لبويضات اللبائن عندما يكون حجم الجريبة حوالي 3 مليمتر والذي يقابل قطر البويضة بين110-120مايكروميتر (8)، كما لوحظ وجود علاقة موجبة بين قطر الجريبة والتكامل التطوري للبويضات مع تطور الجنين من البويضات المستحصل عليها من جريبات بقطر 2-3 مليمتر (9). تهدف هذه الدراسة إلى التنبؤ بقطر الجريبة والبويضة من خلال بعض صفات المبيض وذلك بتحديد مرحلة نضج البويضة استنادا لحجم جريبتها عند استعمالها في بحوث إنتاج الأجنة ونقلها.

المواد وطرائق العمل

أجريت الدراسة في مختبرات الكلية التقنية / المسيب قسم تقنيات الإنتاج الحيواني من أيلول 2008 ولغاية حزيران 2009. جُمعت المبايض (300 مبيض) من 150 نعجة غير حامل تراوحت معدل اعمارها بين (2-5 سنة) والتي ذبحت في مجازر قضاء المسيب في أوقات الصباح الباكر بعد ذبح لحيوانات مباشرة. نُقلت العينات من النعاج بعد ذبحها الى المختبر داخل وعاء بلاستيكي يحتوي على ثلج ومحلول فسلجي طبيعي 0.9 % خلال ساعة واحدة بعد الذبح (10) . غُسلت المبايض في المختبر بالمحلول الفسلجي الطبيعي بدرجة حرارة 30- 35 مئوية ووضعت على اوراق ترشيح (Filter paper) لامتصاص الماء الزائد. عينت الجريبات الناضجة والمنتخبة للفحص المجهري وبلغ مجموعها الكلي (1205) جريبة . أجريت القياسات الخاصة باوزان المبايض بواسطة ميزان الكتروني حساس وابعادها وقطر الجريبة باستعمال المسطرة دالة القياس القدمة (vernia). قُسمت الجريبات الى ست مجاميع حسب اقطارها إلى (1-2 و > 2 -3 و > 3-4 و > 4-5 و > 5-6 و > 6-8 ملم). سُحب السائل الجريبي من الجريبات بوساطة محقنة طبية حجم 2 مللتر و 5 ملليتر وابرة قياس 23 (Gauge23) تحتوي على 0.1 مليلتر من الوسط الزرعي محلول دارئ الفوسفات (phosphate Buffer Saline; PBS) واضيفت له مادة الهيبارين[2] بنسبة 25IU/ml فضلا عن مادة الكليسيرول ، وبعد ازالة الجزء المدبب منها عن طريق البرد باستعمال حجر سن ناعم ليصبح غير مدبب وذلك لغرض منع تسرب السائل الجريبي عند ادخالها للجريبة ووضع السائل الجريبي في طبق زجاجي لتقويم البويضات ومرحلة نضجها (6). فُحصت العينات باستخدام المجهر الضوئي بقوة تكبير 400 ، وتم التاكد من وجود البويضات في المحلول بعد أخذ قطرة على شريحة أوطبق زجاجي ثم صنفت على أساس الشكل والحجم وعدد صفوف الخلايا المحيطة بها. أستعمل البرنامج SAS (11) في التحليل الإحصائي لدراسة تأثير بعض العوامل في قطر الجريبة وقطر البويضة والنضوج، وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات بأختبار دنكن (12) متعدد الحدود. كما أستعمل أختبار مربع كاي للمقارنة بين النسب المدروسة، وأستعمل ذات البرنامج في تقدير معامل الانحدار وأيجاد معادلات الخط المستقيم للعلاقة بين صفات المبيض مع قطر الجريبة والبويضة والنضوج.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج معدل قطر الجريبة مقارنة بنضج البويضات (الجدول 1) أنه عند القطر1-2 ملم والقطر اكبرمن 2-3 ملم تكون اعلى نسبة للبيوض الناضجة وكانت 58.37 و62.66%على التوالي مقارنة مع باقي الاقطار وانخفض معدل البويضات متوسطة النضج بشكل معنوي ($p<0.01$) اذ بلغت 19.16 و 18.54% في حين بلغت نسبة البيوض غير الناضجة 22.47 و 18.80%، وبين الجدول انخفاض نسبة البيوض الناضجة وبشكل معنوي ($p<0.01$) كلما ازداد قطر الجريبة بينما ترتفع نسبة البيوض غير الناضجة وبشكل معنوي ($p<0.01$) كلما ازداد قطر الجريبة. ان البويضات المأخوذة من جريبات صغيرة لم تستطيع بلوغ الانضاج المختبري وقد يعود السبب الى وجود عجز في تصنيع البروتينات اللازمة لمتابعة التكامل التطوري بينما البويضات المسحوبة من جريبات كبيرة تتمكن من بلوغ الانضاج المختبري وقد يعود السبب ربما الى ان اقطار البويضات تكون اكبر نتيجة لتراكم طبقات الخلايا والتي تكون ضرورية لتغذية البويضة . ويمكن ان يحدث التكامل التطوري وتصنيع عامل ضروري من الأم لإسناد الإنضاج والإخصاب ومتابعة التطور الجنيني المبكر لبويضات المسحوبة من جريبات ذات اقطار ما بين2-3 ملم (13و14) اما من ناحية قطر البويضات فان البويضات ذات الاقطار الاقل من 110 مايكروميتر لا يكتمل انضاجها النووي والهيولي Cytoplasm في الاخصاب المختبري لذلك تكون غيرقادرة لاسناد تطورها بينما ذات الاقطار الاكبر من 120 مايكروميتر تحتوي على طبقات متراصة من الخلايا الركمية(Cumulus cells) والتي تكون ضرورية لاكمال تطور البويضة (8) .

جدول (1) عدد البويضات الناضجة ومتوسطة النضج وغير الناضجة بأختلاف قطر الجريبة.

معدل قطر الجريبة	عدد الجريبات	عدد البويضات		
		الناضجة	متوسطة النضج	غير الناضجة
2-1	454	a 265 A (% 58.37)	a 87 B (% 19.16)	a 102 B (% 22.47)
3-2<	383	a 240 A (% 62.66)	b 71 B (% 18.54)	b 72 B (% 18.80)
4-3<	160	b 77 A (% 48.12)	c 37 B (% 23.13)	c 46 B (% 28.75)
5-4<	98	c 44 A (% 44.90)	d 23 B (% 23.47)	d 31 B (% 31.63)
6-5<	62	d 24 A (% 38.71)	e 14 B (% 22.58)	d 24 A (% 38.71)
8-6<	28	e 12 A (% 42.86)	e 09 B (% 32.14)	e 07 B (% 25.00)
المجموع	1205	682	241	282

الحروف الصغيرة للمقارنة عموديا (فئات قطر الجريبة في أعداد البويضات بأختلاف نضجها). الحروف الكبيرة للمقارنة أفقيا (بين نسب البويضات الناضجة والمتوسطة النضج وغير الناضجة)، الحروف المختلفة تعني وجود فروق معنوية ($P<0.01$).

بالنسبة الى موقع المبيض فان صورة التغيرات الحاصلة على الجريبات في الأيمن والأيسر مبينة في الجدول (2)، إذ ارتفعت بشكل معنوي ($p<0.05$) نسبة الجريبات الواقعة على المبيض الايسر وبلغت 55.19 % بينما بلغت نسبة الجريبات على المبيض الايمن 44.81% اما فيما يتعلق بقطر الجريبة وعلاقته بموقع المبيض فان معدل قطر الجريبة لايختلف معنويا بين المبيض الايمن والايسر فيما ازداد وبشكل معنوي($p<0.05$) قطر بويضات المبيض الايسر عن الايمن اذا كان قطر البويضة في الايسر 117.89مايكروميتر بينما بلغ في الايمن 111.97مايكروميتر (الجدول 3). هذه النتائج تتوافق مع (15) اذ بين عند دراسته التطور الجنيني لمبيض الاغنام ان المبيض الايسر اكثر فعالية فسلجية من المبيض الايمن وكذلك اوضح (16) ان المبيض الايسر اكبر قليلا واكثر نشاطا من المبيض الايمن.

جدول (2) أختلاف عدد الجريبات بأختلاف موقع المبيض.

موقع المبيض	عدد الجريبات	النسبة%
المبيض الايمن	540	44.81
المبيض الايسر	665	55.19
المجموع	1205	% 100
قيمة مربع كاي (χ^2)	-----	* 5.39

* ($P<0.05$).

جدول (3) علاقة موقع المبيض بقطر الجريبة(مليميتر) وقطر البويضة(مايكروميتر).

موقع المبيض	عدد الجريبات	المتوسط ± الخطأ القياسي	
		قطر الجريبة	قطر البويضة
المبيض الايمن	540	0.07 ± 2.78	a 1.78 ±111.97
المبيض الايسر	665	0.08 ± 2.83	b 2.01 ± 117.89
مستوى المعنوية	1205	Ns	*

المتوسطات التي تحمل حروفا مختلفة ضمن العمود الواحد تختلف معنويا فيما بينها.

* ($P<0.05$)، Ns : غير معنوي.

يتبين من الجدول (4) معاملات انحدار ومعادلات التنبؤ (الخط المستقيم) صفتي قطر الجريبة والبويضة على صفتي سمك النطاق الشفاف وعدد الجريبات ، إذ يلاحظ ان هنالك انحدارا موجبا وعالي المعنوية لقطر الجريبة على سمك النطاق الشفاف بلغ معامله 0.096 ملم/مايكروميتر، أي ان قطر الجريبة يزداد بمقدار 0.096 ملم لكل مايكروميتر واحد إضافي من سمك النطاق الشفاف وبمعامل تحديد قدره 0.62 أي ان سمك النطاق الشفاف يفسر 62% من قطر الجريبة في الأغنام. وفي الوقت الذي كان فيه

انحدار قطر الجريبة على عدد الجريبات موجبا إلا انه لم يبلغ حد المعنوية ، وبلغ معامله 0.022 ملم / جريبة وبمعامل تحديد بلغ 0.19 ، وأظهر الجدول أن قطر البويضة يزداد بمعنوية عالية ($p< 0.01$) مع زيادة كل من سمك النطاق الشفاف وكذلك عدد الجريبات، إذ بلغ معامل الانحدار 1.77 ملم/مايكروميتر و0.910 ملم/جريبة وبمعامل تحديد 0.71 و 0.78 على التوالي.ومن خلال هذه النتائج يمكننا التنبؤ بقطر الجريبة وقطر البويضة من خلال سمك النطاق الشفاف وعدد الجريبات.

جدول (4) انحدار قطر الجريبة وقطر البويضة على سمك النطاق الشفاف وعدد الجريبات.

الصفات المنحدرة	معامل الانحدار (b)	معادلة الخط المستقيم	مستوى المعنوية	معامل التحديد
انحدار قطر الجريبة على سمك النطاق الشفاف	0.096 ملم/مايكروميتر	Y^ = 1.145 + 0.096 (X)	**	0.62
انحدار قطر الجريبة على عدد الجريبات	0.022 ملم /جريبة	Y^ = 2.71 + 0.022 (X)	Ns	0.19
انحدار قطر البويضة على سمك النطاق الشفاف	1.77 مايكروميتر/مايكروميتر	Y^ = 88.44 + 1.77 (X)	**	0.71
انحدار قطر البويضة على عدد الجريبات	0.910 مايكروميتر/جريبة	Y^ = 107.07 + 0.910 (X)	**	0.78

** ($P<0.01$)، Ns: غير معنوي.

يتضح من الجدول (5) معاملات انحدار قطر الجريبة وقطر البويضة على وزن المبيض وأبعاده المقاسه في هذه الدراسة. وفي الوقت الذي كان فيه انحدار قطر الجريبة على وزن المبيض 0.046 ملم/سم وعلى طول المبيض 0.356 ملم/سم وعلى عرض المبيض 0.123 ملم/سم وكذلك انحدار قطر البويضة على وزن المبيض 0.023 ملم/سم وقطر البويضة على ارتفاع المبيض 0.0067 ملم/سم غير معنوي، فان انحدار قطر الجريبة على ارتفاع المبيض وقطر البويضة على طول المبيض وانحدار قطر البويضة على عرض المبيض كان موجبا وعالي المعنوية ($p< 0.01$) وبلغ معامله 6.57 ملم/سم و6.12 ملم/سم و1.87 ملم/سم وبمعاملات تحديد بلغت 0.61 و0.57 و0.42 على التوالي. ان هذه النتائج تعكس إمكانية التنبؤ بقطر الجريبة وقطر البويضة من خلال وزن المبيض وأبعاده وهذا يعد ضروريا جدا عند وضع خطط التحسين وتحديدا موضوع الانتخاب غير المباشر(17) .

جدول (5) انحدار قطر الجريبة وقطر البويضة على وزن المبيض وأبعاده .

الصفات المنحدرة	معامل الانحدار (b)	معادلة الخط المستقيم (التنبؤ)	مستوى المعنوية	معامل التحديد
انحدار قطر الجريبة على وزن المبيض	0.046 ملم/غم	Y^ = 2.32 + 0.046 (X)	Ns	0.29
انحدار قطر الجريبة على طول المبيض	0.356 ملم/سم	Y^ = 2.66 + 0.356 (X)	Ns	0.35
انحدار قطر الجريبة على عرض المبيض	0.123 ملم/سم	Y^ = 2.78+ 0.123 (X)	Ns	0.23
انحدار قطر الجريبة على ارتفاع المبيض	6.57 ملم/سم	Y^ = -2.32 + 6.57 (X)	**	0.61
انحدار قطر البويضة وزن المبيض	0.023 مايكرون/غم	Y^ = 114.53 + 0.023 (X)	Ns	0.17
انحدار قطر البويضة على طول المبيض	6.12 مايكرون/سم	Y^ = 107.44 + 6.12 (X)	**	0.57
انحدار قطر البويضة على عرض المبيض	11.78 مايكرون/سم	Y^ = 100.59+11.78 (X)	**	0.42
انحدار قطر البويضة على ارتفاع المبيض	0.0067 مايكرون/سم	Y^ = 102+ 0.0067 (X)	Ns	0.38

** ($P<0.01$)، Ns: غير معنوي.

يظهر من الجدول (6) ان التباين في الملاحظات والمشاهدات المشخصة على البويضة والسايتوبلازم فضلا عن النشاط الجريبي كان معنويا (p< 0.01). فيما يخص كل من قطر الجريبة وقطر البويضة ففي قطر الجريبة تبين ان معدلاتها لوجود النطاق الشفاف وانتشار تام للسايتوبلازم ووجود النطاق الشفاف وانتشار جزئي للسايتوبلازم وسايتوبلازم نصفي والنطاق الشفاف غير واضح ووجود الركمة المبيضية و وجود التاج المشع و البيضة مجردة ولايوجد نشاط جريبي كانت 2.75 ، 2.69، 2.45، 2.34، 2.51، 2.78، 2.22 و0.00 ملم اما قطر البويضة وبنفس الترتيب فقد بلغ 116.28، 117.67، 113.34، 116.47 ، 118.77 ، 112.34، 113.09 و0.00 مايكروميتر على التوالي.

جدول (6) العلاقة بين قطر الجريبة والبويضة مع الملاحظات أو المشاهدات المشخصة على البويضة والسايتوبلازم والنشاط الجريبي.

ت	الملاحظة أو المشاهدة المشخصة	العدد	المتوسط ± الخطأ القياسي	
			قطر الجريبة	قطر البويضة
1	وجود النطاق الشفاف وانتشار تام للسايتوبلازم	652	a 0.19 ± 2.75	a 1.33 ± 116.28
2	وجود النطاق الشفاف وانتشار جزئي للسايتوبلازم	146	a 0.05 ± 2.69	a 0.78 ± 117.67
3	سايتوبلازم نصفي (جهة واحدة)	80	a 0.06 ± 2.45	a 0.45 ± 113.34
4	النطاق الشفاف غير واضحة (غير مميزة)	65	a 0.23 ± 2.34	a 1.58 ± 116.47
5	وجود الركمة المبيضية	81	a 0.12 ± 2.51	a 1.35 ± 118.77
6	وجود التاج المشع	55	a 0.12 ± 2.78	a 2.01 ± 112.34
7	البيضة العارية (المجردة)	56	a 0.09 ± 2.22	a 1.44 ± 113.09
8	لايوجد نشاط جريبي	70	b 0.00 ± 0.00	b 0.00 ± 0.00
مستوى المعنوية		1205	**	**

** (P<0.01).

يتبين من الجدول (7) أن زيادة وزن المبيض تزداد معنويا (p< 0.05) من قطر الجريبة وكذلك درجة النضج وبمعامل ارتباط قدره 0.20 و0.16 على التوالي(جدول 12).أظهرت نتائج الدراسة الحالية أن معامل الارتباط بين قطر الجريبة وقطر البويضة موجب وعالي المعنوية وبلغ معامله 0.55 في حين العلاقة عكسية (p< 0.01) بين كل من قطر الجريبة والنضج (-0.47) وقطر البويضة والنضج (-0.61) .

جدول (7) معامل الارتباط أو التلازم بين المتغيرات والصفات المدروسة

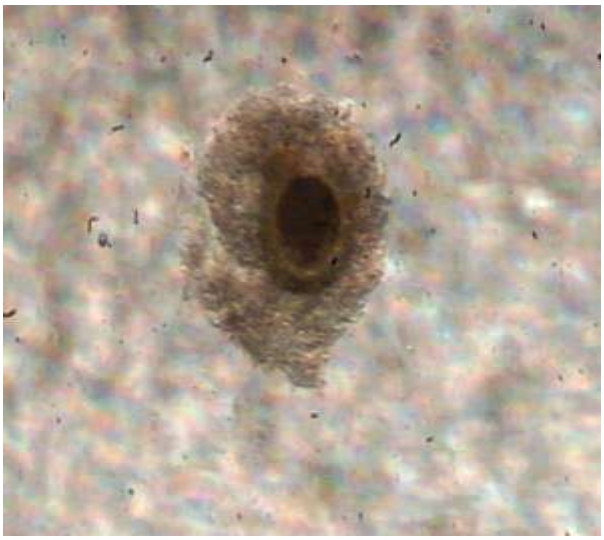
الصفات المرتبطة	معامل الارتباط (r)	مستوى المعنوية
3 و 4	0.20	*
3 و 5	0.03	Ns
3 و 6	0.16	*
4 و 5	0.55	**
4 و 6	0.47-	**
5 و 6	0.61-	**

1: العمر (3 - 4.5 سنة)– 2: الوزن الحي عند الذبح – 3: وزن المبيض – 4: قطر الجريبة – 5: قطر البويضة – 6: النضج.* (P<0.05)، Ns: غير معنوي.** (P<0.01)

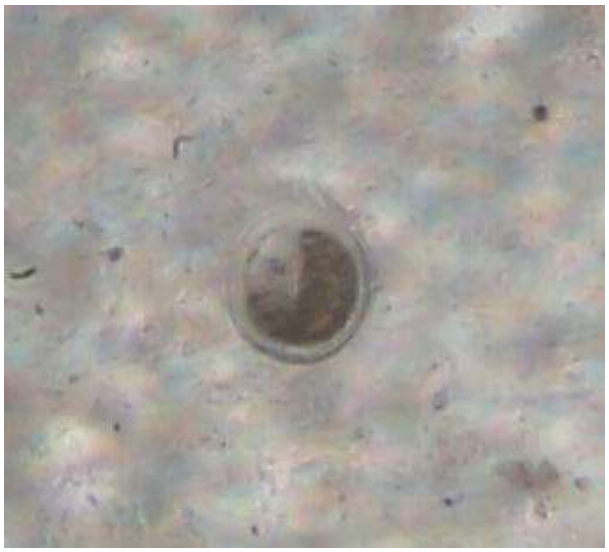
اظهرت نتائج فحص البيوض ان هنالك حالات طبيعية وغير طبيعية بالبيوض اذ بينت وجود صف واحد من الخلايا الركمية(صورة 1) و وجود صفين من الخلايا الركمية(صورة 2) ووجود ثلاث صفوف من الخلايا الركمية (صورة 3) في حين كان نوع السايتوبلازم جزئي (صورة 4) وكليا (صورة 5) ومفصصاً (صورة 6) اما بالنسبة لطبقة النطاق الشفاف كانت مكتملة (صورة 7) وغير مكتملة (صورة 8) .

صورة (1) توضح صف واحد من الخلايا الركمية لجريبة بقطر 2.5ملم وبويضة بقطر 115 مايكرميتر (400X)

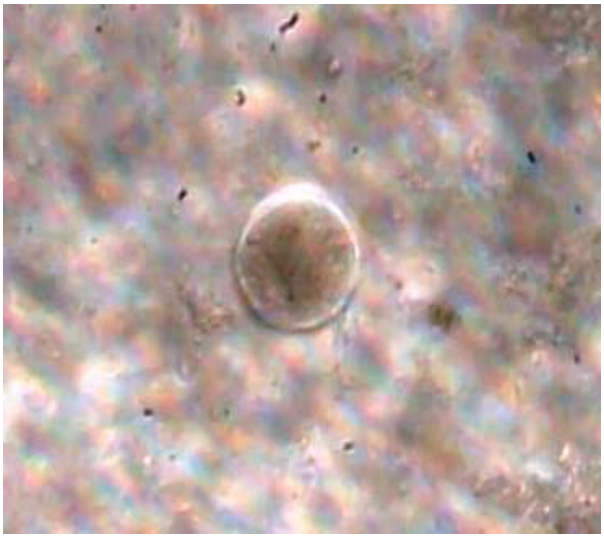
صورة (2) توضح صفين من الخلايا الركمية لجريبة بقطر 2.5ملم وبويضة بقطر 120 مايكرميتر (400X)



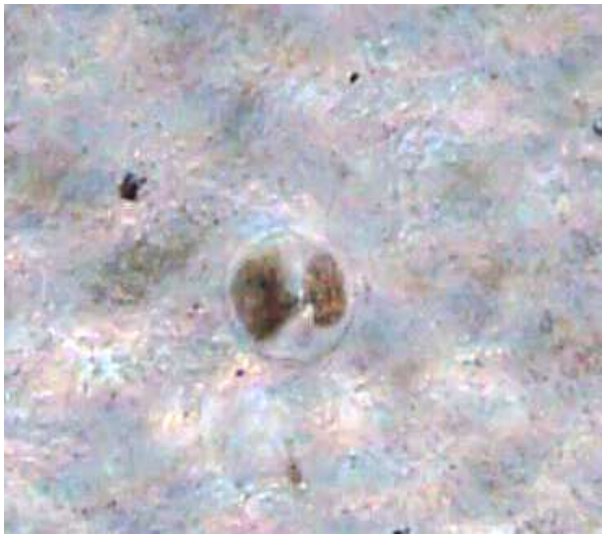
صورة (3) توضح ثلاث صفوف من الخلايا الركمية لجريبة بقطر 2ملم وبويضة بقطر 120 مايكرميتر (400X)



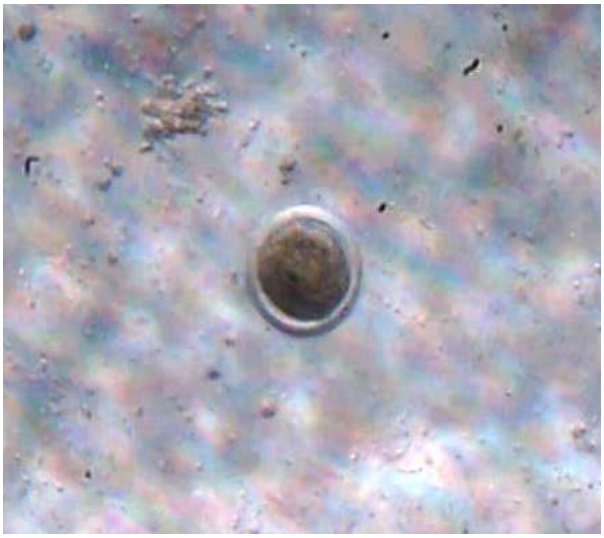
صورة (4) توضح نوع السايتوبلازم جزئي لجريبة بقطر 2ملم وبويضة بقطر 120 مايكرميتر(400X)



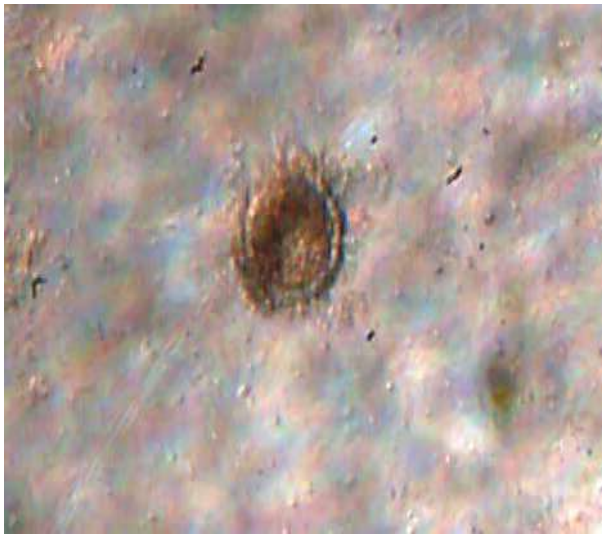
صورة (5) توضح نوع السايتوبلازم كلي لجريبة بقطر 1.5ملم وبويضة بقطر 120 مايكرميتر (400X)



صورة (6) توضح نوع السايتوبلازم مفصص لجريبة بقطر 3ملم وبويضة بقطر 120 مايكرميتر (400X)



صورة (7) توضح طبقة النطاق الشفاف مكتملة لجريبة بقطر 2.5ملم وبويضة بقطر 115 مايكرميتر (400X)



صورة (8) توضح طبقة النطاق الشفاف غير مكتملة لجريبة بقطر 2.5ملم وبويضة بقطر 110 مايكرميتر (400X)

نستنتج من هده الدراسه ان قطر الجريبه 2-3 مليمترا والذي يقابله قطر البويضه 115-120 مايكروميتر هو القطر المناسب لأختيار البويضة لغرض الأستعمالات العلمية المختلفة مثل أخصاب البويضة خارج جسم الكائن الحي ونقل الأجنة وتطورها والبحوث المتعلقة بالوراثة الجنينية .

References

1. Kim , J.Y.; Kinoshita , M. ; Ohnishi , M. and Fukui,Y.(2001). Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen- thawed immature and in vitro bovine oocytes . Reprod .; 122: 131 – 138.
2. Vajta , G. ; Lewis , L. M. ; Hyttel , P.; Thomas, G. A. and Trounson , A.O. (2001). Somatic cell cloning with micro manipulators. Cloning ,3 : 89 – 95.
3. Cognie , Y. ; Baril , G . ; Poulin , P. and Mermilod , P .(2003) . Current status of embryo technologies in sheep and goat . Theriogenology , 62 : 1182 – 1191.
4. Samake , S . ; Amoah , E.A. ; Mobini , S. ; Gazal , O. and Gelaye , S . (2000) . In vitro fertilization of goat oocytes during the non breeding season . Small Ruminant Res .; 35: 49 – 54.
5. Iwata , H.; Inouo, J.; Kimura , K . ; Kuge , T.; Kuwayama , T. and Mouji , Y.(2006). Comparison between the characteristics of the follicular fluid and development competence of bovine oocytes . Anim. Reprod. Sci. ; 19 : 215-223.
6. Nandi , S . ; Girish Kumar , V. ; Manjunatha , B. M .; and Gupta , P. S . P . (2007) . Biochemical composition of ovine follicular fluid in relation to follicle size . Journal compilation , Japanes society of Developmental Biologist . Growth Differ. 49 : 61- 66 .
7. Leroy , J . L . M . R .; Vanholder , T . and Delanghe , J . R . (2004) . Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different – sized follicles and their relationship to serum in dairy cows . Anim . Reprod . Sci .; 80 : 201 – 211 .
8. Fair, T. ; Hyttel , P. and Greve, T. (1995) . Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcription activity. Mol. Reprod. Dev.; 42: 437 – 442 .
9. Crozet , N. ; Ahmed –Ali , M. and Dubos , M. P. (1995). Development competence of goat oocyte from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro . J. Repord .fertil .;103 : 293-298 .
10. Dooly , V. G. (1983) . Follicular oocytes maturation for use in bovine exogenous and in vitro fertilization. Ph . D. Thesis , Michigan state university , USA.
11. SAS.(2001).SAS/STAT, Users Guide for Personal Computer .SAS Institute Inc., Cary, N.C.,USA.
12. Duncan, D.B.(1955). Multiple Range and Multiple Test . Biometrics. 11:1- 42.
13. Barnes , F. L . ; Kausche , A . ; Tiglias , J . ; Wood , C. ; Wilton , L . and Trounson , A . (1996) . Production of embryos from in vitro – matured primary human oocytes . Fertil. Steril.; 65 : 1151 – 1156 . (cited by Adam et al., 2009)
14. Gall, L.; Desmedt , V.; Crozet, N. and Sevellecy, C. (1996). Meiotic all in competence goat oocyte timing of nuclear events and protein phosphorylation. Theriogenology.; 46 : 825 – 835.
15. Macnatty , K.P. ; Smith , N.L. ; Hudson , D.A.; Heath , D.J.; Tisdall , W.S. and Braw , R. (1995) .Development of the sheep ovary during fetal and neonatal Life and the effect of fecundity gene .J. Reprod . Fert . Suppl.; 49 : 123-135.
16. Robert S. J .(1970). Infertility in animals. In: Veterinary obstetrics and genital disease (Theriogenology) . 2nd (ed). Edwards Brothers (Ed) inc. Ann Arbor Michigan. U.S.A.P.604-725.

17. جلال ، صلاح وكرم حسن (2003) . تربية الحيوان . دار المعارف، الطبعة الرابعة ، القاهرة.