

**KUANTITAS DAN KUALITAS SEL TELUR ANJING LOKAL  
DARI BERBAGAI STADIUM ESTRUS**

**QUANTITY AND QUALITY OF LOCAL BITCH'S OOCYTES AT VARIOUS OESTRUS PHASE**

**Yuda Heru Fibrianto<sup>1</sup>, Tri Wahyu Pangestiniingsih<sup>2</sup>, Amelia Hanna<sup>1</sup>, Pudji Astuti<sup>1</sup>,  
Claude Mona Airin<sup>1</sup>, Asyhari<sup>1</sup>, Amrullah Anindito<sup>1</sup>, Nuraini Rachmawati<sup>1</sup>,  
Koko Kurniawan<sup>1</sup>, Pradityo Yoga Wibowo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Bagian Fisiologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

<sup>2</sup>Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

Email: fibrianto1802@gmail.com

**ABSTRACT**

The objective of this research was to study the quantity and quality of oocytes from bitch ovary at various estrus phase collected from Yogyakarta, Indonesia area. This study used the ovary obtained from 5 bitches each estrus phase after ovariohysterectomized at clinic veterinary practice. Ovary were placed in 0.9% physiological saline added 1% penicilline-streptomycin with temperature 37°C and then brought to laboratory. Ovary washed several times used PBS and oocytes were obtained by slicing ovarian tissue in tissue culture medium (TCM)-199 supplemented with 25 mM Hepes, 1% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin and then inspected, selected and recorded under microscope. The result of this study were oocyte from proestrus was the best grade (G1) was estrus ( $31 \pm 5.24$ ), anestrus ( $20.8 \pm 14.18$ ), and diestrus ( $11.2 \pm 9.39$ ). Oocyte grade 2 (G2) was estrus ( $7.4 \pm 4.34$ ), diestrus ( $7 \pm 9.70$ ), and anestrus ( $6.8 \pm 7.16$ ); and grade 3 the worst oocyte (G3) was oocyte from diestrus ( $13.4 \pm 10.53$ ), estrus ( $7.4 \pm 8.47$ ), and anestrus ( $2.8 \pm 1.30$ ). This result showed that highest quantity and quality of oocytes was from estrus phase followed by anestrus and diestrus.

**Key words:** bitch, oocytes, estrus, anestrus, diestrus

**ABSTRAK**

Penelitian ini ditujukan untuk mengungkap kuantitas dan kualitas sel telur anjing lokal dari ovarium berbagai stadium estrus yang ada di Yogyakarta, Indonesia. Kompleks kumulus-sel telur dikoleksi dari ovarium yang diperoleh dari anjing yang mengalami ovariohisterektomi dan dibawa ke laboratorium dalam larutan 0.9% NaCl 37°C. Sel telur diperoleh dengan cara memotong tipis-tipis ovarium di dalam media *Tissue culture medium* (TCM)-199 dengan 25 mM Hepes, 1% *fetal bovine serum* (FBS) dan 1% larutan penisillin-streptomisin, dikoleksi dan diseleksi di bawah mikroskop dan didata berdasarkan stadium estrus dari ovariumnya dan dikelompokkan kedalam sistem *grading* kualitas oositnya. Sebanyak 5 pasang ovarium setiap stadium estrusnya digunakan untuk penelitian ini. Hasil diperoleh bahwa jumlah oosit dengan kelas terbaik (G1) berturut turut dari yang tertinggi adalah fase estrus ( $31 \pm 5.24$ ), anestrus ( $20.8 \pm 14.18$ ), dan diestrus ( $11.2 \pm 9.39$ ). Oosit kelas 2 (G2) berturut-turut dari yang tertinggi adalah fase estrus ( $7.4 \pm 4.34$ ), diestrus ( $7 \pm 9.70$ ), dan anestrus ( $6.8 \pm 7.16$ ). Serta untuk oosit kelas terjelek (G3) berturut-turut dari yang tertinggi adalah fase diestrus ( $13.4 \pm 10.53$ ),

estrus ( $7.4 \pm 8.47$ ), dan anestrus ( $2.8 \pm 1.30$ ). Kuantitas terbanyak dan kualitas terbaik dari sel telur anjing adalah sel telur yang berasal dari ovarium stadium estrus diikuti stadium anestrus dan diestrus

**Kata kunci:** sel telur anjing, anestrus, proestrus, diestrus

## PENDAHULUAN

Hasil kloning anjing *afghanhound* pertama telah lahir di dunia (Lee dkk., 2005). Keberhasilan teknologi kloning pada hewan ini merupakan terobosan baru di dalam dunia keilmuan, walaupun hasil yang luar biasa ini diperoleh dengan menggunakan sel telur yang masak secara alami di dalam tubuh (*in vivo*) dari anjing yang digunakan sebagai pendonor sel telur. Pemakaian sel telur secara *in vivo* ini dikarenakan kurang berhasil dalam pemasakan sel telur diluar tubuh (*in vitro*) yang umumnya dilakukan pada kloning hewan lain (Lanza dkk., 1999).

Pencarian metode untuk memelihara spesies anjing langka dari kemusnahan telah memacu penelitian dalam hal fisiologi, morfologi, perkembangan dan pemasakan sel telur serta untuk meningkatkan tingkat keberhasilan pemasakan di luar tubuh (*in vitro maturation*) dan pembuahan di luar tubuh (*in vitro fertilization*) pada anjing (Rocha dkk., 2006).

Sampai kini, jumlah oosit yang terlibat dalam fertilisasi *in vitro* relatif kecil dan kesimpulan yang pasti mengenai prosedur yang paling baik belum bisa dibuat (Hunter, 1995). Banyak faktor yang dapat mempengaruhi keberhasilan fertilisasi *in vitro*, salah satunya kuantitas dan kualitas oosit (Hafez dan Hafez, 2000). Kuantitas dan kualitas oosit dapat

ditentukan dari keberhasilan teknik pengambilan oosit. Oosit dengan kualitas baik akan mendukung terjadinya proses fertilisasi *in vitro* (*in vitro fertilization*, IVF) (Gordon, 1994).

Dalam setiap studi yang membahas maturasi *in vitro* dan fertilisasi *in vitro*, salah satu yang menjadi perhatian utama adalah kualitas dan kuantitas oosit yang dikoleksi. Klasifikasi oosit secara khas dinilai dari penampilan sitoplasma dan ada tidaknya lapisan sel kumulus. Fase-fase siklus estrus mungkin juga berpengaruh terhadap kualitas dan kuantitas oosit yang dikoleksi, walaupun penelitian tentang pengaruh fase siklus estrus tersebut masih terbatas. Fujii dkk., (2000); Rodrigues dan Rodrigues, (2003); dan Cui dkk., (2006) telah melaporkan kuantitas dan kualitas oosit pada berbagai siklus estrus, tetapi disana tidak disertakan penggolongan grade (kelas) dan jumlah oositnya secara terinci pada setiap fase siklus estrus. Oleh karena itu penulis tertarik untuk mengadakan penelitian yang lebih terinci tentang jumlah dan kualitas oosit dari ovarium anjing pada berbagai fase siklus estrus.

## MATERI DAN METODE

Bahan penelitian. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain ovarium anjing betina sehat, umur lebih dari 6 bulan yang diperoleh dari saluran peranakan anjing setelah operasi

ovariohisterektomi pada klinik praktek dokter hewan; 0,9 % NaCl Fisiologis; PBS (*Phosphate Buffered Saline*); Penisillin dan streptomisin (Sigma, USA); *Tissue Culture medium* (TCM)-199 (Gibco, USA); 25 mM Hepes (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*) (Sigma, USA); 1% *Bovine serum*.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain cawan petri; skalpel; gunting; pinset; termometer; termos penyimpan ovarium; mikroskop stereo/inverted dengan fluorescen; mikropipet.

Koleksi ovarium dilakukan dari anjing betina sehat, umur lebih dari 6 bulan yang diperoleh setelah operasi ovariohisterektomi pada klinik praktek dokter hewan. Saluran peranakan ditempatkan pada larutan 0,9 % NaCl fisiologis yang telah ditambah penisillin dan streptomisin kemudian dimasukkan kedalam termos dengan temperatur sekitar 35-37 °C, selanjutnya dibawa ke laboratorium.

Stadium siklus estrus dievaluasi berdasarkan pengujian bentukan gambaran luar dari ovarium setelah ovarium tersebut diambil dari saluran peranakannya. Gambaran khusus yang digunakan sebagai kriteria Otoi dkk. (2002) adalah : Anestrus, ovari tanpa folikel atau jaringan lutea, Estrus (fase follikuler), terlihat adanya satu atau lebih follikel (diameter 2-10 mm), Diestrus (fase luteal), terlihat adanya satu atau lebih korpus luteum.

Koleksi sel telur dilakukan dengan cara ovarium diambil dan dicuci beberapa kali dengan PBS. Koleksi oosit dilakukan dengan metode pencacahan. Metode pencacahan dilakukan dengan cara mencacah ovarium dengan menggunakan skalpel

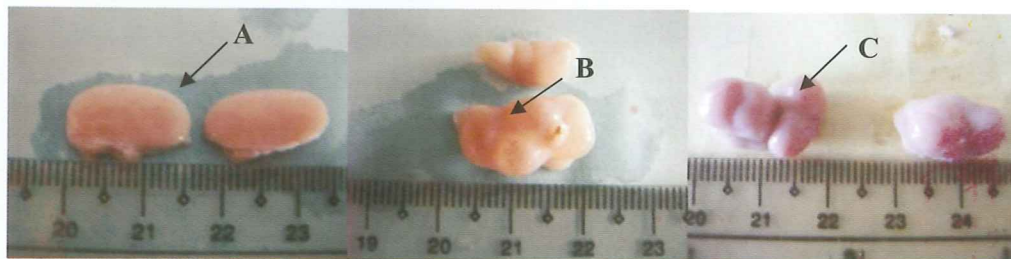
pada suhu ruangan dalam medium *Tissue Culture medium* (TCM)-199 dengan 25 mM Hepes, 1 % *Bovine Serum* dan 1 % larutan penicillin-streptomisin. Kemudian dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop untuk mencari dan menyeleksi oosit. Klasifikasi kualitas oosit yang dipakai berdasarkan metode Hewitt (1997), untuk seleksi dibagi menjadi 3 tipe kelas, yaitu: *Grade 1* : Oosit berwarna gelap dan sepenuhnya dikelilingi oleh satu atau lebih lapisan sel kumulus. *Grade 2* : Oosit transparan dengan lapisan sel kumulus yang tidak sempurna. *Grade 3* : Oosit pucat, tidak utuh, dan tanpa lapisan sel kumulus.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

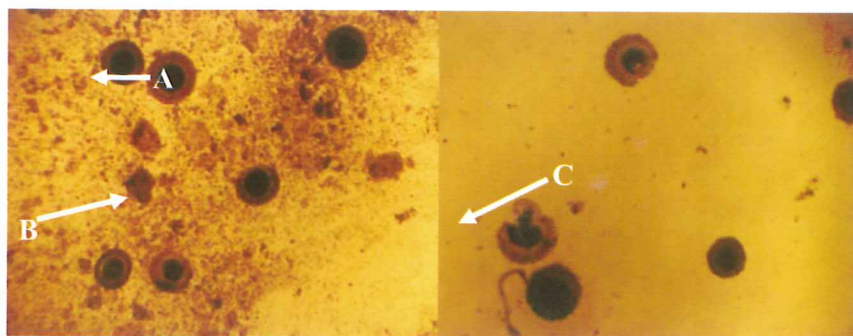
Koleksi ovarium dari 15 ekor anjing yang terdiri dari 5 anjing anestrus, 5 anjing estrus, dan 5 anjing diestrus. Setelah dilakukan koleksi oosit dengan metode pencacahan didapatkan jumlah total rerata oosit anjing berturut-turut dari yang tertinggi adalah fase estrus ( $45.8 \pm 16.51$ ), diestrus ( $31.6 \pm 22.65$ ), dan anestrus ( $30.4 \pm 21.98$ ) dengan perincian sebagai berikut: oosit dengan kelas terbaik (G1) berturut turut dari yang tertinggi adalah fase estrus ( $31 \pm 5.24$ ), anestrus ( $20.8 \pm 14.18$ ), dan diestrus ( $11.2 \pm 9.39$ ). Sedangkan oosit kelas 2 (G2) berturut-turut dari yang tertinggi adalah fase estrus ( $7.4 \pm 4.34$ ), diestrus ( $7 \pm 9.70$ ), dan anestrus ( $6.8 \pm 7.16$ ). Serta untuk oosit kelas terjelek (G3) berturut-turut dari yang tertinggi adalah fase diestrus ( $13.4 \pm 10.53$ ), estrus ( $7.4 \pm 8.47$ ), dan anestrus ( $2.8 \pm 1.30$ ) (Tabel 1).

Tabel 1. Jumlah total oosit anjing (Mean ± SD) dari berbagai stadium siklus estrus berdasarkan kelas (grade).

Oosit	Anestrus (n=5)	Estrus (n=5)	Diestrus (n=5)
<b>Total</b>	30.4 ± 21.98	45.8 ± 16.51	31.6 ± 22.65
<b>Grade 1 (G1)</b>	20.8 ± 14.18	31 ± 5.24	11.2 ± 9.39
<b>Grade 2 (G2)</b>	6.8 ± 7.16	7.4 ± 4.34	7 ± 9.70
<b>Grade 3 (G3)</b>	2.8 ± 1.30	7.4 ± 8.47	13.4 ± 10.53



Gambar 1. A. Ovarium fase anestrus, ovarium tanpa folikel atau jaringan lutea; B. Ovarium fase estrus (fase follikuler), terlihat adanya satu atau lebih follikel (diameter 2-10 mm) (tanda panah hitam); C. Ovarium fase diestrus (fase luteal), terlihat adanya satu atau lebih korpus luteum (tanda panah putih).



Gambar 2. (A) Oosit *grade 1*: Oosit berwarna gelap dan sepenuhnya dikelilingi oleh satu atau lebih lapisan sel kumulus. (B) Oosit *grade 2*: Oosit dengan lapisan sel kumulus yang tidak sempurna. (C) Oosit *grade 3*: Oosit pucat, tidak utuh, dan atau tanpa lapisan sel kumulus (10 x 3.2 x 4)

Hasil koleksi oosit ini sesuai dengan yang dilaporkan Cui dkk., (2006), yang mengatakan bahwa jumlah dan kualitas oosit yang dikoleksi dari 20 ovarium berturut-turut dari yang tertinggi adalah fase estrus (sekitar 300 oosit), fase anestrus (sekitar 200 oosit), dan fase luteal (sekitar 50 oosit). Namun jauh lebih sedikit dan berbeda dari yang dilaporkan

oleh Fujii dkk., (2000) serta Rodrigues dan Rodrigues, (2003). Penelitian yang dilakukan oleh Fujii dkk., (2000), didapatkan jumlah total rerata oosit berturut-turut dari yang tertinggi adalah fase anestrus ( $236.3 \pm 86.8$ ), Metestrus ( $206.0 \pm 107.3$ ), dan estrus ( $104.5 \pm 29.5$ ), sedangkan Rodrigues dan Rodrigues, (2003), didapatkan jumlah total rerata

oosit berturut-turut dari yang tertinggi adalah fase anestrus ( $156.8 \pm 122$ ), estrus ( $156.5 \pm 117.9$ ), dan diestrus ( $91.5 \pm 66.4$ ).

Hasil koleksi oosit grade 1 juga lebih sedikit dari yang dilaporkan Fujii dkk., (2000) dan beberapa peneliti lain. Fujii dkk., (2000), melaporkan jumlah oosit grade 1 fase anestrus  $74.3 \pm 19.2$ , estrus  $58.5 \pm 21.0$ , metestrus  $95.8 \pm 42.7$ . Peneliti lainnya melaporkan oosit grade 1 fase anestrus  $36.8 \pm 8.1$  (Rota dan Giorgia, 2004),  $46.5 \pm 6.1$  (Martins dkk., 2006), fase estrus  $62.2 \pm 8.2$  (Martins dkk., 2006). Sedangkan untuk jumlah oosit grade 2 dan grade 3 pada berbagai siklus estrus belum di laporkan.

Pada karnivora lain misalnya kucing, jumlah rerata oosit yang diperoleh pada fase anestrus  $21.6 \pm 2.9$ , fase estrus  $18.8 \pm 4.4$ , dan fase diestrus  $20.9 \pm 5.8$  (Karja dkk., 2002). Melihat hasil ini, dengan metode koleksi yang sama jumlah rerata oosit pada kucing lebih rendah dari jumlah rerata oosit anjing. Pada mamalia lain seperti biri-biri rerata diperoleh 8.1 (aspirasi) dan 6.3 (pencacahan) oosit per ovarium. Dengan jumlah rerata oosit kualitas terbaik 3.3 (pencacahan) dan 1.8 (aspirasi) (Shirazi dkk., 2005). Pada kambing, jumlah rerata oosit yang dikoleksi bervariasi  $2.7 \pm 0.15$  (aspirasi),  $2.2 \pm 0.13$  (pembedahan),  $2.4 \pm 0.12$  (pencacahan) (Pawshe dkk., 1994). Pada kerbau, jumlah rerata oosit yang diperoleh 5,7 (pencacahan), 2,6 (pembedahan), 1,7 (aspirasi) (Das dkk., 1996). Pada kuda, jumlah rerata oosit yang diperoleh 1,75 (aspirasi) dan 4,14 (pencacahan) (Choi dkk., 1993). Jumlah oosit yang lebih sedikit pada kambing, biri-biri, kuda, kerbau, dan sapi ini dimungkinkan karena hewan-hewan ini termasuk hewan *monotocus* berbeda dengan anjing

yang termasuk hewan *polytocus*.

Banyak faktor yang mempengaruhi jumlah dan kualitas oosit anjing. Koleksi dengan teknik yang berbeda menghasilkan hasil yang bervariasi. Metode aspirasi meskipun cepat dan sederhana tetapi tidak umum digunakan pada anjing dengan beberapa alasan. Pertama, durasi anestrus dan diestrus, dimana pada fase tersebut tidak nampak folikel pada permukaan ovarium, relatif lama. Kedua, aspirasi folikel sangat sulit dilakukan pada ovarium anjing yang kecil. Ketiga, jumlah oosit yang dikoleksi dengan metode aspirasi lebih sedikit dibandingkan dengan metode pencacahan (Nickson dkk., 1993), yang biasa digunakan pada anjing (Luvoni dkk., 2005). Pada kambing (Pawshe dkk., 1994) dan beberapa hewan lain (kuda, sapi, kerbau, biri-biri) (Choi dkk., 1993; Das dkk., 1996; Shirazi dkk., 2005), metode pencacahan menghasilkan lebih banyak oosit dengan kualitas baik dibandingkan dengan teknik aspirasi.

Digesti ovari dari anjing *crossbreed* menghasilkan lebih banyak ( $351.8 \pm 52.4$ ) dibandingkan anjing *purebred* ( $288.1 \pm 43.6$ ) (Durrant dkk., 1998). Walaupun demikian, ketika koleksi dengan pencacahan (Strom-Holst dkk., 2001; Rodriguest dan Rodrigues, 2003) tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap jumlah total oosit yang dikoleksi. Tidak ada pengaruh yang signifikan antara berat badan anjing donor dengan jumlah total oosit yang dikoleksi (Strom-Holst dkk., 2001).

Umur anjing mempengaruhi jumlah total oosit yang dikoleksi (Rodrigues dan Rodrigues, 2003), faktanya , rerata oosit yang dikoleksi menurun 4.7

setiap tahun (Strom-Holst dkk., 2001). Hal menarik bahwa meskipun pada anjing muda terdapat sedikit folikel dari pada anjing dewasa, tapi jumlah oosit yang dikoleksi lebih tinggi. Pengaruh adanya poliovular pada anjing muda mungkin yang mengakibatkan ketidaksesuaian ini (Telfer dan Gosden, 1987). Anjing yang belum mengalami pubertas memiliki kualitas oosit rendah dimana ukuran oosit kecil, lapisan sel kumulus belum sempurna, dan tingkat pemasakannya rendah (Nickson dkk., 1993).

Masih jadi perdebatan ketika status reproduksi dipertimbangkan, ada atau tidak ada tampak folikel atau jaringan luteal tidak berpengaruh signifikan terhadap jumlah oosit yang dikoleksi (Nickson dkk., 1993; Durrant dkk., 1998; Rodrigues dan Rodrigues, 2003; Fujii dkk., 2000), walaupun ada kecenderungan jumlah oosit yang lebih banyak pada ovarium yang memiliki folikel (Strom-Holst dkk., 2001; Cui dkk., 2006).

Untuk mendapatkan jumlah dan kualitas oosit yang tinggi maka perlu mengkombinasikan beberapa faktor yang telah disebutkan diatas. Kombinasi factor umur dan status reproduksi anjing donor adalah alasan kuat untuk hasil koleksi oosit yang tinggi (Luvoni dkk., 2005). Temperatur tempat penyimpanan ovarium dan teknik koleksi oosit yang digunakan juga perlu diperhatikan untuk mendapatkan jumlah dan kualitas oosit yang terbaik.

Hasil penelitian menyimpulkan bahwa jumlah oosit anjing yang paling tinggi adalah pada fase estrus (total rerata  $45.8 \pm 16.51$ ) dan jumlah oosit kualitas terbaik (G1) yang paling banyak juga pada fase estrus (jumlah rerata kualitas terbaik  $31 \pm 5.24$ ).

Oosit kualitas terbaik ini yang digunakan untuk maturasi *in vitro*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada PHKA2 tahun 2007 yang telah membiayai penelitian ini dengan dana PHKA2 Bacth I, sehingga penelitian ini berjalan dengan baik dan lancar.

## DAFTAR PUSTAKA

- Choi, Y.H., Hochi, S., Braun, J., Sato, K., Oguri, N. 1993. In vitro maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and by the slicing of ovaries. *Theriogenology*; 40(5): 959-966.
- Cui, X.S, Jin, Y.X., Shen, X.H., Lee, J.Y., Lee, H.S., Yin, X.J., Kong, I.K., Kim, N.H. 2006. Epidermal growth factor enhances meiotic resumption of canine oocytes in the presence of BSA. *Theriogenology*; 66: 267-274
- Das, G.K., Jain, G..C., Solanki, V.S., Tripathi, V.N. 1996. Efficacy of various collection methods for oocyte retrieval in buffalo. *Theriogenology*; 46 (8): 1403-1411.
- Durrant, B.S., Pratt, N.C., Russ, K.D., Bolamba. D. 1998. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. *Theriogenology*; 49: 917-32.
- Fujii, M., Otoi, T., Murakami, M., Tanaka, M., Une, S., Suzuki, T. 2000. The quality and maturation of bitch oocytes recovered from ovaries by the slicing method. *J Vet Med Sci*; 62(3): 305-7.
- Gordon, I. 1994. *Laboratory production of Cattle Embryos. 2<sup>nd</sup> Edition*, C.A.B Publishing.

- Hafez E.S.E., Hafez, B. 2000. *Folliculogenesis, Egg Maturation, and ovulation in in Farm Animal*. 7<sup>th</sup> Ed. Lea and febiger, Philadelphia.
- Hewitt, D.A. 1997. *Oocyte Maturation and Fertilisation in the Bitch; The Use of In Vitro Culture*. PhD Thesis, University of London.
- Hunter, R.H.F. 1995. *Fisiologi dan Teknologi Reproduksi Hewan betina domestic*. Penerbit institute teknologi, Bandung.
- Karja, N.W.K, Otoi, T., Murakami, M., Fahrudin, M., Suzuki, T. 2002. In vitro maturation, fertilization, and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology*; 57: 2289–2298.
- Lanza, R.P., Cibelli, J.B., West, M.D. 1999. Human therapeutic cloning. *Nat Med*; 5: 975-7.
- Lee, B.C., Kim, M.K., Jang, G., . Oh, H.J., Fibrianto, Y., Kim, H.J., Hossein, M.S., Kim, J.J., Kang, S.K., Schatten, G., Hwang, W.S. 2005. Dogs cloned from adult somatig cell. *Nature*; 436: 641.
- Luvoni, GC., Chigioni, S., Allievi, E., Macis, D. 2005. Factors involved in vivo and in vitro maturation of canine oocytes. *Theriogenology*; 63: 41–59.
- Martins, L.R., Ponchirolli, C.B., Beier, S.L., Landim-Alvarenga, F.C., Lopes, M.D. 2006. Analysis of nuclear maturation in in vitro matured oocytes from estrous and anestrous bitches. *Anim. Reprod.*; 3(1): 49-54.
- Nickson, D.A., Boyd, J.S., Eckersall, P.D., Ferguson, J.M., Harvey, M.J.A., Renton, J.P. 1993. Molecular biological methods for monitoring oocyte maturation and in vitro fertilization in bitches. *J Reprod Fertil Suppl*; 47: 231–40.
- Otoi, T., Willingham, L., Shin, T., Kraemer, D.C., Westhusin, M. 2002. Effect of oocyte culture density on meiotic competence of canine oocyte. *Reproduction*; 124: 775-781.
- Pawshe, C.H., Totey S.M., Jain, S.K. 1994. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*; 42 (1): 117–125.
- Rocha, A.A., Bastos, R., Cunha, I.C.N., Adona, PP., Santos, J.A. 2006. Quantity and Quality of Oocytes Recovered from Donor Bitches of Different Ages. *Theriogenology*; 66: 1465–1467.
- Rodrigues, B.A., Rodrigues, J.L. 2003. Influence of reproductive status on in vitro oocyte maturation in dogs. *Theriogenology*; 60: 59–66.
- Rota, A., Giorgia, C. 2004. In vitro maturation rates of canine oocytes from anoestrous bitches in simple media. *Reprod. Nutr. Dev.*; 44: 105–109.
- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi N., Hosseini S.M. 2005. A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for in vitro maturation. *Small Ruminant Research*; 58: 283–286.
- Strom-Holst, B., Larsson, B., Rodrigues-Martinez, H., Lagerstedt, A.S., Linde-Forsberg, C. 2001. Prediction of the oocyte recovery rate in the bitch. *J Vet Med A.*; 48: 587–92.
- Telfer, E., Gosden, R.G. 1987. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fertil*; 81: 137–47.