

مطالعه روند تکامل ساختار بافتی لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه گاو میش

دکتر نعیم آلبوغبیش Ph.D.^{*}، دکتر حسن مروتی D.V.M.^{*}

^{*} دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه بافت‌شناسی

[†] آدرس مکاتبه: اهواز، صندوق پستی ۱۴۵-۶۱۳۵۵، دانشکده دامپزشکی، گروه بافت‌شناسی

چکیده

*** هدف:** مطالعه شروع فعالیت جنسی گاو میش نر، بررسی ساختار بافتی لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه و تعیین زمان شروع فعالیت تولید اسپرماتوزوئید (اسپرماتوژنز)

*** مواد و روشها:** در این پژوهش از بیضه ۳۰ رأس گاو میش از سنین بدو تولد تا ۳۶ ماهگی پس از بررسی اولیه، نمونه‌هایی به ضخامت ۵/۰ سانتی‌متر برداشته و جهت ثبوت در فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند. برشهای میکروسکوپی به ضخامت ۵-۶ میکرومتر به روش تهیه مقاطع بافتی معمول تهیه و پس از رنگ آمیزی H & E مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند.

*** یافته‌ها:** نتایج مشاهدات میکروسکوپی به دست آمده نشان داد که لوله‌های اسپرم‌ساز در سن ۳/۵ ماهگی ساختمانی لوله‌ای شکل و دارای حفره داخلی کاملاً مشخصی هستند. تا سن ۹ ماهگی در بافت پوششی دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز، مراحل اسپرماتوژنز مشاهده نشد. در سن یک‌سالگی پیچ‌خوردگی و ضخامت دیواره بافت پوششی لوله‌های اسپرم‌ساز افزایش یافته و سلولهای لیدینگ به تعداد زیادی با هسته‌های روشن و سیتوپلاسم اسیدوفیلی کف‌آلود در دستجات بزرگی مشاهده شدند. همچنین سلولهای جنسی اولیه (PGC) Primordial Germ Cell با هسته‌هایی تیره و سیتوپلاسم بازوفیلی وسیعی مشاهده شدند. در این سن سلولهای سرتولی، اسپرماتوگونی، سلولهای اسپرماتوسیت اولیه با هسته‌ای بزرگ و کروماتین رشته‌ای، سلولهای اسپرماتید با هسته‌ای کروی، تیره و کوچک و سلولهای اسپرماتوزوئید با هسته‌ای تیره و کشیده با تاژک مشخص، مشاهده شدند. در سن یک‌و نیم سالگی میزان پیچ‌خوردگی و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و سلولهای لیدینگ به طور قابل توجهی افزایش یافته و سلولهای جنسی اولیه در این سن نیز مشاهده شدند. فعالیت اسپرماتوژنز به طور کامل وجود داشت؛ در سن ۲/۵ سالگی، تکامل ساختار بافتی لوله‌های اسپرم‌ساز به طور قابل توجهی ادامه داشت و نکته مهم آنکه در این سن، سلولهای جنسی اولیه در قاعده لوله‌های اسپرم‌ساز قابل مشاهده است؛ در سن ۳ سالگی، ساختار بافتی کامل لوله‌های اسپرم‌ساز و فعالیت‌های اسپرماتوژنز در لوله‌های اسپرم‌ساز مشاهده شد.

*** نتیجه‌گیری:** به طور کلی مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت اسپرماتوژنز از سن ۹ ماهگی شروع می‌شود ولی فعالیت کامل آن در سن یک سالگی صورت می‌گیرد که با گزارش‌های موجود در رابطه با فعالیت کامل اسپرماتوژنز بیضه گاو در ماه‌های دهم و یازدهم قابل مقایسه است.

کل واژگان: بافت‌شناسی، روند تکامل، لوله‌های اسپرم‌ساز، گاو میش

مقدمه

یکی از عوامل اصلی باروری اووسیت، اسپرماتوزوئید است و شروع تولید اسپرماتوزوئید (اسپرماتوژنز) و در حقیقت فعالیت جنسی جنس نر همزمان با بلوغ جنسی است. شروع اسپرماتوژنز در پستانداران مختلف و بسته به شرایط آب و هوایی منطقه در سنین مختلفی صورت می‌گیرد. به طوری که اولین سرویس جفت‌گیری گاو میش در هند و پاکستان، ۳ تا ۳/۵ سالگی گزارش شده است (۱)، ولی Ahmad و همکارانش در گزارشی، اسپرماتوزوئیدهای متحرک در مایع انزالی گاو میش را در سن ۲۵ ماهگی مشاهده نموده‌اند (۲). Nordin و همکارانش در یک بررسی بر روی علل بلوغ دیررس گاو میش، اسپرم متحرک را تا قبل از ۳۲ ماهگی مشاهده نکرده‌اند (۳). Mccool و همکارانش، بلوغ گوساله گاو میش را در استرالیا در سن ۲۴ ماهگی گزارش نموده‌اند (۴).

بنابراین مطالعه ساختار بافتی بیضه و بویژه بافت پوششی دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز و روند رشد و تکامل سلولهای اسپرماتوژنیک و تولید اسپرماتوزوئید به منظور ارزیابی فعالیت تولید مثلی جنس نر دارای اهمیت بسیاری است.

لذا با توجه به اینکه در شرایط آب و هوایی منطقه خوزستان و گاو میشهای بومی این منطقه تاکنون هیچ‌گونه مطالعه میکروسکوپی در خصوص روند رشد و تکامل سلولهای اسپرماتوژنیک لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه گاو میش و به‌طور کلی ارزیابی فعالیت تولید مثلی آن صورت نگرفته، مطالعه حاضر انجام شده است.

مواد و روشها

مطالعه و بررسیهای انجام شده در این پژوهش شامل مراحل زیر است:

* بخش اول: نمونه‌برداری

در این پژوهش، بیضه حدود ۳۰ رأس گاو میش از سنین بدو تولد تا ۳۶ ماه کشتار شده، در کشتارگاه اهواز در فصل زمستان مطالعه شد، نمونه‌ها پس از تخمین سن به روش فرمول دندان‌ی به چهار گروه سنی زیر تقسیم شدند:

گروه سنی الف) از ۳/۵ ماهه تا ۶ ماهه با میانگین سنی $4/79 \pm 0/99$ (۷ نمونه)
گروه سنی ب) از ۷ ماهه تا ۱۱ ماهه با میانگین سنی $8/43 \pm 0/9$ (۶ نمونه)
گروه سنی ج) از ۱۲ ماهه تا ۲۳ ماهه با میانگین سنی $15/33 \pm 3/16$ (۹ نمونه)
گروه سنی د) از ۲۴ ماهه تا ۳۶ ماهه با میانگین سنی $28/29 \pm 4/53$ (۷ نمونه)
پس از بررسی اولیه به منظور ثبت^۱، نمونه‌ها بلافاصله در محلول فرمالین ۱۰٪ قرار داده شدند.

تعیین سن بر اساس فرمول دندان‌ی

تعداد و ترتیب دندانهای گاو میش شبیه به گاو است با این تفاوت که دندانهای گاو میش در سنین بالاتر قویتر و تیزتر هستند. اولین جفت دندان موقت معمولاً در هفت روزگی کامل می‌شود ولی سه جفت دیگر در سنین مختلف ظاهر می‌شوند. تمامی دندانهای پیشین

موقت در سن ۹ ماهگی دچار سائیدگی می‌شوند (۵). دندانهای دائمی به ترتیب زیر ظاهر می‌شوند:

جفت اول	۲/۵-۳ سالگی
جفت دوم	۳/۵-۴ سالگی
جفت سوم	۴-۵ سالگی
جفت چهارم	۵-۵/۵ سالگی

* بخش دوم: تهیه مقاطع میکروسکوپی

برای مطالعات میکروسکوپی از بیضه گاو میش در رده‌های سنی موردنظر، به روش معمول، برشهای میکروسکوپی به ضخامت ۶ میکرومتر تهیه و با رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، رنگ آمیزی شدند.

در این روش مراحل تهیه برش میکروسکوپی به ترتیب شامل ثبت (فرمالین بافر)، آبیگری^۱ (الکل اتیلک با غلظت صعودی ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۰۰) شفاف کردن، آغشته‌گی با پارافین^۲، قالب‌گیری^۳، برش دادن، رنگ آمیزی هماتوکسیلین و ائوزین، مونته کردن است (۶).

* بخش سوم: مطالعه برشهای میکروسکوپی

در این بخش ساختار بافت پوششی دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز و سلولهای تشکیل دهنده آن که شامل مطالعه ساختار میکروسکوپی، پراکندگی و موقعیت سلولهای اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوسیت ثانویه، اسپرماتید و اسپرماتوزوئید در بافت پوششی لوله‌های اسپرم‌ساز و همچنین پراکندگی موقعیت و ساختار بافتی سلولهای جنسی اولیه (PGC)، سلولهای سرتولی، سلولهای لیدینگ و سفید پرده در سنین مختلف مطالعه و بررسی شد.

یافته‌ها

* گروه الف) شامل سنین ۳/۵، ۴، ۵ و ۶ ماه

نتایج مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که در سن ۳/۵ ماهگی بافت بیضه گاو میش توسط سفید پرده ضخیم و دو لایه‌ای پوشیده شده که یک لایه عروقی در زیر آن مشاهده می‌شود. لوله‌های اسپرم‌ساز با دیواره نسبتاً نازک با حفره‌ای در مرکز و به تعداد زیادی مشاهده شدند. در دیواره این لوله‌ها، سلولهای اولیه جنسی به تعداد زیادی با هسته‌ای هتروکروماتین بزرگ و سیتوپلاسمی بازوفیلی و وسیعی قابل تمایز بودند. علاوه بر آن، سلولهای اسپرماتوگونی با هسته‌ای کروی، تیره و سیتوپلاسم اسیدوفیلی، بیشتر در قاعده لوله‌های اسپرم‌ساز و در مجاورت تیغه پایه دیده شدند. سلولهای سرتولی با هسته‌ای کاملاً یوکروماتین و هستک مشخص با سیتوپلاسمی اسیدوفیلی به تعداد زیاد بین سلولهای دیگر قرار داشت.

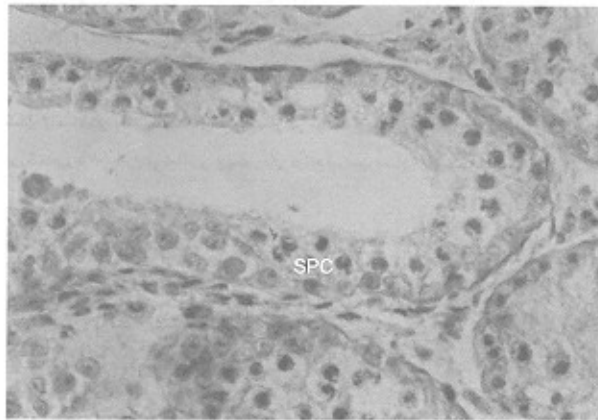
- 1- Fixation
2. Dehydration
3. Impregnation
4. Blocking

روند تکامل لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه

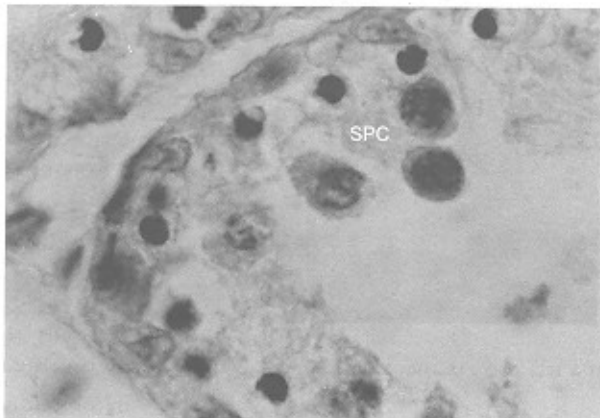
اسیدوفیلی روشن مشاهده شدند. همچنین سلولهای سرتولی بسیار مشخصی با هستک کاملاً واضح و برجسته در بین سلولهای بافت پوششی دیواره لوله اسپرم‌ساز قرار داشتند. ضخامت دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز نسبت به گروه الف افزایش و سلولهای اسپرماتوگونی با هسته‌هایی تیره، کروی و کوچک به تعداد بیشتری مشاهده شدند.

سلولهای جنسی اولیه در بافت پوششی دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز در سن ۹ ماهگی نیز مشاهده گردیده و ضخامت لوله‌های اسپرم‌ساز به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. همچنین هسته سلولهای سرتولی بزرگتر شده و دستجات سلولهای لیدینگ به تعداد بیشتری مشاهده شدند.

در این سن سلولهای اسپرماتوگونی به‌صورت هسته‌های تیره، کروی و کوچک در قاعده دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز دیده شدند و پنیچ خوردگی لوله‌های اسپرم‌ساز افزایش یافت. سراحل اسپرماتوژنز در تعداد کمی از لوله‌ها با تشکیل اسپرماتوسیت‌های اولیه، اسپرماتید و اسپرماتوزوآ مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳).

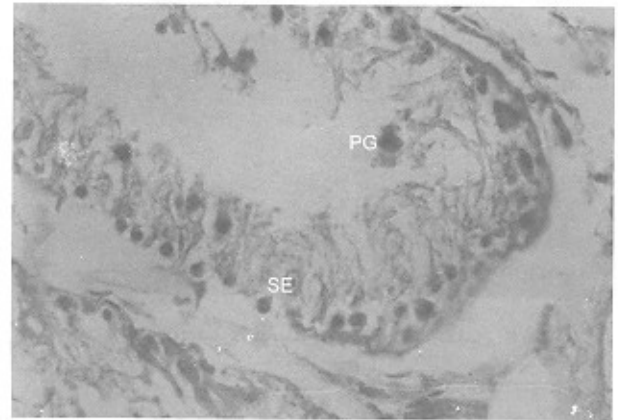


شکل ۲: ساختار بافتی دیواره لوله اسپرم‌ساز بیضه گاو میش ۹ ماهه (رنگ آمیزی H & E، بزرگنمایی ۱۰۰×). مشاهده سلولهای اسپرماتوسیت اولیه (SPC) در این سن قابل توجه است.



شکل ۳: لوله اسپرم‌ساز بیضه گاو میش ۹ ماهه از رنگ آمیزی H & E، بزرگنمایی ۱۰۰×. سلولهای اسپرماتوسیت اولیه (SPC) در سطح بافت پوششی لوله‌های اسپرم‌ساز

لوله‌های اسپرم‌ساز توسط بافت همبند سستی با سلولهای فیروپلاست فراوان احاطه شده و سلولهای لیدینگ به تعداد کمی در این بافت همبند مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱: ساختار بافتی دیواره لوله اسپرم‌ساز بیضه گاو میش ۳/۵ ماهه (رنگ آمیزی H & E، بزرگنمایی ۱۰۰×). ضخامت کم بافت پوششی تشکیل دهنده دیواره لوله اسپرم‌ساز در این سن که فقط سلولهای اسپرماتوگونی (SP)، سرتولی (SE) و سلولهای جنسی اولیه (PG) در آن مشاهده می‌شود، قابل توجه است.

در سن ۴ ماهگی روند تکامل ساختار بافت بیضه در مقایسه با سن ۳/۵ ماهگی تفاوت قابل توجهی نداشت.

در سن ۵ ماهگی تعداد سلولهای سرتولی افزایش قابل توجهی یافته و سلولهای اولیه جنسی به‌طرف قاعده دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز متغایل شده و تعداد سلولهای اسپرماتوگونی با هسته تیره کروی و کوچک افزایش و نظم پیدا کرده که در لایه‌های آنها سلولهای سرتولی قرار داشتند.

پیچ خوردگی لوله‌های اسپرم‌ساز در این سن افزایش یافته و سلولهای لیدینگ با هسته روشن و سیتوپلاسم اسیدوفیلی واکوتل دار به شکل چند ضلعی مشاهده شدند.

ساختار بافت بیضه در سن ۶ ماهگی از نظر کلی شبیه سن ۵ ماهگی بود ولی پیچ خوردگی لوله‌ها افزایش یافته، تیغه پایه ضخیم و سلولهای فیروپلاست اطراف لوله‌های اسپرم‌ساز رنگ بیشتری به‌خود گرفته و سلولهای میوند تغییر شکل یافته‌اند.

سلولهای جنسی اولیه در قاعده لوله‌های اسپرم‌ساز منجمع‌تر شده‌اند.

گرود ب) شامل سنین ۸، ۷ و ۹ ماهه

در سن ۷ ماهگی تعداد سلولهای جنسی اولیه در دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز بیضه گاو میش کاهش یافته و تعداد سلولهای اسپرماتوگونی با تقسیمات میتوزی افزایش می‌یابد. اندازه و تعداد سلولها لیدینگ در این سن افزایش یافت.

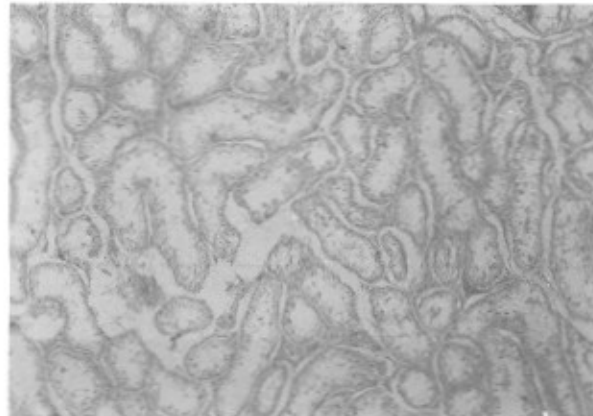
در سن ۸ ماهگی سلولهای جنسی اولیه با اندازه‌های بزرگ و سیتوپلاسم بازوفیلی و سلولهای لیدینگ با سیتوپلاسم



گروه ج) شامل سنین ۱ و ۱/۵ ساله

در سن ۱ سالگی مراحل کامل اسپرماتوزونز با تولید سلولهای اسپرماتوزوآ در تعداد زیادی از لوله‌های اسپرم‌ساز که پیچ خوردگی و ضخامت آنها افزایش یافته بود، مشاهده شد. همچنین سلولهای جنسی اولیه یا هسته‌های تیره و سیتوپلاسم بازوفیلی وسیع در دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز قرار داشتند.

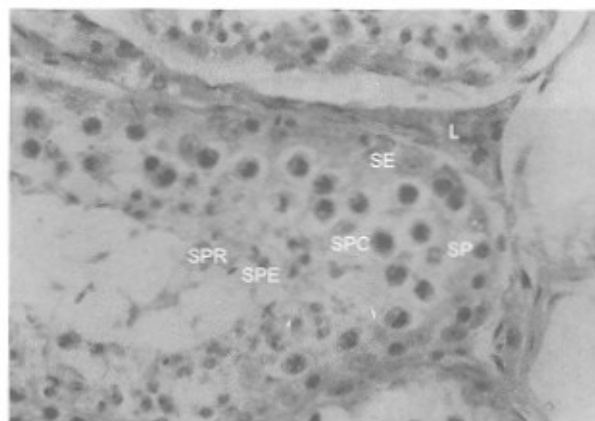
در سن ۱/۵ سالگی میزان پیچ خوردگی و قطر لوله‌های اسپرم‌ساز و سلولهای لیدینگ به‌طور قابل توجهی افزایش یافته و سلولهای جنسی اولیه نیز قابل مشاهده بودند (شکل ۴).



شکل ۴: ساختار بافتی لوله‌های اسپرم‌ساز در بیضه گاو میش ۱/۵ ساله (رتک‌آبیزی: B & H بزرگنمایی: ۲۵x). افزایش تعداد و پیچ‌خوردگی لوله‌های اسپرم‌ساز قابل توجه است.

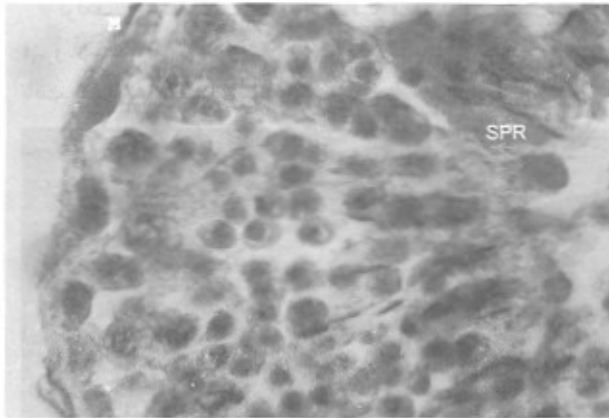
گروه د) شامل سنین ۲، ۲/۵ و ۳ سالگی

در سن ۲ و ۲/۵ سالگی سلولهای اسپرماتوزونیک دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز از نظر تقسیم سلولی و تمایز به سلولهای اسپرماتوزونید فعالتر هستند. بافت بینابینی، سلولهای لیدینگ و میتوئید نیز رشد و تکامل بیشتری دارند. سلولهای جنسی اولیه نیز قابل رؤیت بودند (شکل‌های ۵ و ۶).



شکل ۵: ساختار بافتی دیواره لوله اسپرم‌ساز بیضه گاو میش ۱/۵ ساله (رتک‌آبیزی: B & H بزرگنمایی: ۲۵x)

مشاهده مراحل مختلف اسپرماتوزونز همراه با افزایش ضخامت بافت پوششی نمایانگر فعال شدن و تکامل لوله‌های اسپرم‌ساز است. در این فوتوگراف قابل توجه است سلولهای اسپرماتوسیت اولیه (SPC)، سلولهای اسپرماتوئید (SPE)، سلولهای اسپرماتوزونید (SPR)، سلولهای لیدینگ (L)، سلولهای سرتولی (SE)، سلولهای اسپرماتوگوننی (SP)، سلولهای جنسی اولیه (PG)



شکل ۶: ساختار بافتی لوله اسپرم‌ساز بیضه گاو میش دوساله (رتک‌آبیزی: B & H بزرگنمایی: ۲۵x)

افزایش ضخامت دیواره لوله اسپرم‌ساز و افزایش تراکم سلولهای اسپرماتوزونید (SPR) در سطح رسی این تیبوم لوله اسپرم‌ساز قابل توجه است؛ سلولهای میتوئید (M)

در سن ۳ سالگی ساختمان کامل بیضه بالغ مشاهده گردید و تعداد سلولهای اسپرماتوسیت اولیه، اسپرماتوئید و اسپرماتوزونید افزایش قابل توجهی داشت.

بحث

بررسی نتایج میکروسکوپی که به دست آمده نشان می‌دهد که پارانشیم بافت بیضه گاو میش همچون دیگر پستانداران که اساساً از لوله‌های اسپرم‌ساز تشکیل شده است از سن ۳/۵ ماهگی به شکل لوله‌های شکل و دارای حفره میانی است. این لوله‌ها تا سن ۱۲ ماهگی صرفاً از تعداد زیادی سلولهای جنسی اولیه، اسپرماتوگوننی و سلولهای سرتولی تشکیل شدند و مراحل اسپرماتوزونز و اسپرماتوزونید در آنها مشاهده نشد. بنابراین بیضه گاو میش تا قبل از یک سالگی از نظر فعالیت جنسی و باروری تکامل لازم را پیدا نکرده است. از سن یک سالگی به بعد، مشاهده سلولهای اسپرماتوگوننی، اسپرماتوسیت اولیه، ثانویه، اسپرماتوئید و اسپرماتوزونید نمایانگر از فعال شدن لوله‌های اسپرم‌ساز از نظر اسپرماتوزونز و تولید اسپرماتوزونید است؛ هر چند در سن ۹ ماهگی نیز در تعدادی از لوله‌های اسپرم‌ساز، سلولهای اسپرماتوزونید مشاهده شد ولی شروع فعالیت کامل تولید اسپرماتوزونید لوله‌های اسپرم‌ساز در سن یک سالگی است. در سن ۲ تا ۲/۵ سالگی مراحل کامل تولید اسپرماتوزونید و همچنین ساختار بافتی تکامل یافته لوله‌های اسپرم‌ساز، بافت بینابینی، سلولهای لیدینگ و میتوئید نیز مشاهده شد.

در سن ۳/۵ سالگی مراحل کامل تولید اسپرماتوزونید سلولهای جنسی اولیه به تعداد زیاد و سلولهای اسپرماتوگوننی به تعداد کمتری با هسته گروی و کوچک در قاعده دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز وجود دارند. با افزایش سن به تدریج از تعداد سلولهای جنسی اولیه کاسته و به تعداد سایر سلولها اسپرماتوزونز افزوده می‌گردد به طوری که در سن ۳ سالگی مراحل مختلف تمایز سلولی و تولید اسپرماتوزونید کامل اسپرماتوزونز در دامنه وسیعی مشاهده شد.

لوله‌های اسپرم‌ساز این نلیوم اسپرماتوزونیک وجود داشته و تکثیر و تمایز سلولهای مختلف سیکل اسپرماتوزونیک مشاهده شد و با افزایش سن پیچ خوردگی، قطر کل لوله‌های اسپرم‌ساز، ضخامت اپی‌نلیوم و وسعت حفره مرکزی افزایش قابل توجهی نوده است که با مقایسه گزارشهای موجود، سن بلوغ و شروع فعالیت کامل تولید اسپرماتوزونیک در گاو میشهای منطقه در سنین پایین‌تری صورت می‌گیرد.

با توجه به نتایج به‌دست آمده موارد زیر برای مطالعات بیشتر پیشنهاد می‌شود:

- ۱) از سن یک سالگی به بعد میزان باروری گاو میش نر مطالعه و ارتباط میزان باروری آن با روند تکامل ساختار بافتی بیضه مشخص شود.
- ۲) با توجه به شرایط آب و هوایی منطقه خوزستان، ساختار بافتی بیضه گاو میش در فصول گرم و سرد مورد مطالعه و مقایسه قرار گیرد.
- ۳) شروع فعالیت ترشح سلولهای لیدینگ با استفاده از تکنیکهای هیستوشیمیایی مشخص گردد.
- ۴) روند تکامل ساختار بافتی بیضه از نظر هیستومتریک نیز مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب تقدیر خود را از آقایان دکتر سید محمد سعید تقدس و غالب بیت شعل و همچنین سرکار خاتم اردلان ایاز می‌دارند.

اولین سرویس جفت‌گیری گاو میش در هند و پاکستان سن ۳ تا ۳/۵ سالگی گزارش شده است (۱).

Ahmad و همکارانش گزارش کرده‌اند که اسپرماتوزونیک متحرک در مایع انزالی گاو میش در سن ۲۵ ماهگی مشاهده شده است (۲).

Nordin و همکارانش در بررسی علل بلوغ دیررس گاو میش، اسپرم متحرک را تا قبل از ۳۲ ماهگی مشاهده نکرده‌اند (۳).

Mccool و همکارانش در یک بررسی بر روی گاو میشهای باتلانی استرالیا، بلوغ گوساله گاو میش نر را در سن ۲۴ ماهگی گزارش نمودند (۴).

Nordin و همکارانش در مطالعاتی که بر روی گاو میشهای باتلانی نر نابالغ مالزیایی از سن ۶ ماهگی تا ۳۲ ماهگی انجام دادند، گزارش نمودند که تا قبل از ۱۲ ماهگی، لوله‌های اسپرم‌ساز از طنابهای توپر تشکیل یافته‌اند که با نتایج حاصل از این تحقیق متفاوت است (۳).

با افزایش سن، تعداد سلولهای لیدینگ و همچنین سلولهای سرتولی نیز افزایش می‌یابد. Azmi و همکارانش، افزایش قابل توجه سلولهای سرتولی در سن بالای ۱۵ ماهگی نسبت به سن ۱۲ ماهگی را گزارش نموده‌اند (۷).

نتیجه مهمی که از این مطالعه به‌دست آمد، این است که در منطقه خوزستان با توجه به شرایط آب و هوایی گرم و خصوصیات نژادی گاو میش منطقه، ساختار بافتی دیواره لوله‌های اسپرم‌ساز بافت بیضه گاو میش برمی در سن یک سالگی کامل شده به‌نحوی که تقریباً در کلیه

References

1. Abdel-Raouf M, EL-Naggar MA, Fateh El-bab MR: The development of the fetal testis in the buffalo. Z Anat Entwicl Gesch 1974; 144: 227-236
2. Ahmad M, Latif M, Arsalan M: Age-related changes in body weight, scrotal size and plasma testosterone levels in buffalo bulls (Bubalus Bubalis). Theriogenology 1984; 226: 561-656
3. Nordin W, Azmi TI, Bongso TA: Light and electron microscopic studies on testicular development in swamp Buffalo. Buffalo seminar Bangkok, Thailand. 1985; 29 Apr-2 May
4. Mccool CJ, Entwistle KW: The development of puberty & sexual Maturity in the Australian Swamp Buffalo Bull. Theriogenology 1989; 32 (2): 171-184
5. FAO: The water Buffalo. F.A.O. Animal production and series, Rome, Italy, 1977; 1: 35
6. Culling CFA: Handbook of Histopathological and Histochemical technique, 3ed, Lea, Febiger (eds). Philadelphia, 1974
7. Azmi TI, Bongso TA, Harisah M, Basrur PK: The sertoli cell of the water Buffalo and electron microscopic study. Sci Fac Veterinary Med And ANIM. Sci Univ Pertanian Malaysia 1990; 93-98

