

TẠO PHÔI TRÂU VIỆT NAM BẰNG THỤ TINH *IN VITRO*

LÊ VĂN TY

Viện Công nghệ sinh học

HOÀNG NGHĨA SON

Viện Sinh học nhiệt đới

NGUYỄN MỘNG HÙNG

Trường đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG Hà Nội

Trâu Việt Nam là gia súc truyền thống gắn liền với nền sản xuất lúa nước và là một mắt xích sinh thái quan trọng của nền nông nghiệp nước ta. Mặc dù có tầm quan trọng nhưng công việc chăn nuôi trâu ở nước ta hiện nay còn chưa được quan tâm. Con trâu bị cạnh tranh bởi con bò ngay cả ở các vùng có điều kiện sinh thái thích hợp nhất cho loài động vật này, cũng như cả ở nơi trình độ chăn nuôi của người dân còn bị hạn chế, đặc biệt ở các vùng núi. Việc đưa ô ạt các giống động vật mới thay thế các loài động vật đã thích nghi lâu đời đang là câu hỏi đặt ra cho chiến lược phát triển bền vững nền chăn nuôi quốc gia.

Nói riêng về đàn trâu, theo số liệu thông kê, hiện nay có xu thế ổn định hoặc giảm đi. Nếu giữ ổn định con số này thì đến năm 2010, đàn trâu Việt Nam có khoảng 3 triệu con. Khi số lượng không thể tăng thì rõ ràng một nhu cầu đặt ra là phải tăng về chất lượng. Sự gia tăng về chất lượng, năng suất và đa dạng về sản phẩm chắc chắn là định hướng cho chăn nuôi trâu trong môi trường cạnh tranh hiện nay. Để đáp ứng nhu cầu này, việc cải tạo di truyền con trâu đang là xu thế tất yếu.

Cấy phôi trâu lần đầu tiên thành công vào năm 1983 [5] tại Hoa Kỳ đã mở ra một khả năng mới đầy nhanh tiến độ di truyền loài động vật này. Tuy nhiên ngay sau đó người ta thấy rằng kỹ thuật gây rụng trứng nhiều ở trâu không đáp ứng được việc đưa công nghệ này vào áp dụng khi mỗi ca gây rụng trứng chỉ có thể tạo ra rất ít nghé. Những năm gần đây, nhờ có bộ dò siêu âm có tần số cao việc hút trứng từ các động vật lớn như trâu được cải tiến, cho phép thu trứng hai lần trong một tuần, đặc biệt

kỹ thuật còn có thể thực hiện trong bất kỳ trạng thái sinh lý nào của con vật; điều mà gây rụng trứng nhiều không thực hiện được đã tạo ra một nguồn nguyên liệu trứng trâu lớn, gọi lại hy vọng sử dụng kỹ thuật này kết hợp với thụ tinh *in vitro* để tạo một lượng phôi lớn từ các động vật có năng suất cao. Kỹ thuật thu trứng bò, trứng trâu bằng ovum-pickup (OPU) đang được cập nhật ở nước ta.

Để chuẩn bị cho việc thụ tinh *in vitro* trứng trâu thu được từ con trâu có năng suất cao, trong khuôn khổ công trình này chúng tôi muốn đưa ra một số kết quả thụ tinh trứng trâu trong ống nghiệm trên nguồn nguyên liệu là trứng thu được từ lò mổ, nhằm tìm hiểu về các điều kiện nuôi thành thực trứng, thụ tinh trứng, nuôi phôi sau khi thụ tinh, tạo ra một mô hình thử nghiệm với các thông số kỹ thuật nhằm tiến tới sản xuất phôi trâu cao sản.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Thu và nuôi thành thực trứng trâu

Thí nghiệm được tiến hành từ tháng 3 đến tháng 4 năm 2004 tại Viện Sinh học nhiệt đới, tp Hồ Chí Minh. Trứng trâu được thu tại lò mổ Vissan, ngay vào lúc mổ trâu trong một buồng vô trùng lưu động có gắn đèn cực tím. Trứng được hút từ các nang có kích thước từ 2 đến 8mm nhờ một xy-lanh 10ml có gắn kim số 18, được bảo quản trong các ống polietylen 10ml chứa 3ml dung dịch Hepes-TCM 199,5 IU/ml heparin, 5% FBS hoặc 5% dịch nang đã được lọc qua màng vô trùng. Phần không gian còn lại của ống được bơm hỗn khí 5% CO₂, 7% O₂,

88% N₂ trộn sẵn từ một gói khí. Ống được đậy kín, giữ trong bộ ổn nhiệt xách tay ở nhiệt độ 38° C và đưa về phòng thí nghiệm.

Tại phòng thí nghiệm, trứng được rửa hai

lần trong ba loại môi trường đồng thời là ba loại môi trường nuôi (bảng 1). Các trứng loại A và B [12], có lớp cumulus toàn vẹn, được chọn để tiến hành nuôi thành thực.

Bảng 1

Các môi trường để nuôi thành thực trứng trâu

Môi trường	Thành phần
M1	TCM 199, 10 % FBS, 50 µM xysteamin, 10 IU/ml eCG, 5 IU/ml hCG, 1µg/ml estradiol
M2	TCM 199, 20 % dịch nang trâu, 50 µM xysteamin
M3	TCM 199, 20 % dịch nang trâu, 3 µg/ml estradiol, 50 µM xysteamin

Dịch nang của buồng trứng trâu (BFF) được thu từ các nang không thoái hoá có đường kính 6-8mm; dịch nang được lọc vô trùng, phân thành các lượng 1ml, bảo quản đông lạnh ở nhiệt độ-20°C, giải đông và dùng hết một lần.

10 trứng được tuyển chọn như vậy được nuôi thành thực trong 1 giọt (50 µl) dung dịch có thành phần nêu trên có phủ dầu, trong đĩa nhựa 5 cm . Trong suốt quá trình thao tác, nhiệt độ của các dung dịch được duy trì ở 36-39°C. Trứng được nuôi thành thực trong 18 đến 20 giờ trong điều kiện hạn chế áp suất O₂, duy trì thành phần khí trộn 5% CO₂, 7% O₂, 88% N₂ trong một hộp nhựa, có đáy chứa nước, được đặt trong tủ nuôi ở nhiệt độ ổn định 39°C. Mỗi thử nghiệm được bố trí sao cho có ít nhất 5 lần lặp lại.

2. Hoạt hoá tinh trùng trâu

Do không có nguồn tinh trùng trâu đông lạnh, thí nghiệm được tiến hành với tinh trùng tươi được thu trực tiếp từ mào tinh hoàn của các con trâu đực từ lò mổ. Trong thời gian vận chuyển, tinh hoàn được giữ trong nước sinh lý vô trùng để đưa về phòng thí nghiệm và tiến hành thu tinh trùng trong vòng 1 giờ. Do có số lượng tinh trùng lớn, tinh trùng được trực tiếp sử lý swim-up trong môi trường Tyrode cải tiến không chứa BSA (Sperm-TALP) 60 phút [8]. Các tinh trùng khoẻ ở pha dung dịch trên được thu lại và ly tâm 200 g, trong 10 phút. Tinh trùng trâu sau khi ly tâm được pha vào dung dịch Sperm-TALP (bảng 2).

Bảng 2

Môi trường thụ tinh in vitro (TALP)

Thành phần	Nồng độ (mM)	mg/100 ml	mg/500 ml
NaCl	100	582	2910
KCl	3,10	23,0	115,0
Na HCO ₃	25,0	209	2910
Na H ₂ PO ₄ H ₂ O	0,29	4,10	20,50
Hepes	10,0	238	1190
Na Lactat (siro 60%)	21,6	368 µl	1840 µl
Phenol Red	1 l/ml	100 µl	500 µl
CaCl ₂ 2H ₂ O	2,10	29,0	145,0
MgCl ₂ 6H ₂ O	1,50	31,0	155,0

3. Thụ tinh trứng trâu

Việc thụ tinh được tiến hành trong các giọt 50µl môi trường thụ tinh TALP-IVF (không

chứa BSA hoặc glucoza), có bổ sung 5 IU/ml heparin (H3149, Sigma), 10 mM penixillamin (P4875, Sigma), 15 mM hypotôrin (H1384, Sigma) và 1 mM epinephrin (E4250, Sigma).

Môi trường được cân bằng trong pha khí và nhiệt độ trước khi chuyển 10 trứng đã thành thực vào. Tinh trùng đã hoạt hóa được ly tâm lần thứ hai, pha lại vào dung dịch TALP-IVF rồi được đưa vào giọt thụ tinh với thể tích sao cho nồng độ của tinh trùng trong giọt môi trường đạt 2×10^6 /ml. Nuôi trứng với tinh trùng trong các điều kiện giống như nuôi thành thực trứng: nhiệt độ 39° C, khí trộn 5% CO₂, 7% O₂, 88% N₂, độ ẩm bão hòa, trong 20-22 giờ.

4. Tạo cụm tế bào ống dẫn trứng trâu

Ống dẫn trứng trâu mới động dục (căn cứ vào mức độ phát triển của thể vàng trên buồng trứng cùng bên) được thu ngay sau khi trâu bị giết mổ. Các ống dẫn trứng này được bảo quản trong dịch sinh lý có bổ sung chất kháng sinh và được chuyển về phòng thí nghiệm. Tại đây, ống dẫn trứng được loại bỏ các mô liên kết mô mỡ bám dính, cắt bỏ phần phễu, nhúng nhanh vào cồn 90⁰ và thấm khô trong vòng 30 giây. Dùng xy-lanh 10ml bơm vào mỗi ống dẫn trứng 1ml dung dịch TCM 199. Dùng kẹp vuốt nhẹ ống theo chiều từ phía tử cung xuống, sao cho lớp niêm mạc bên trong tách rời vào dung dịch chảy vào một ống nhựa 1,5ml. Dùng xy-lanh 10ml với kim 18 hút lên đầy xuống vài lần sao cho các mảnh niêm mạc vỡ ra thành các cụm có kích thước tương đối đồng nhất 200-400µ. Nuôi các cụm tế bào này trong môi trường TCM 199, 10% FBS trong 10-12 giờ; kiểm tra nếu thấy các cụm tế bào chuyển động mạnh nhờ các vi-lông, không bị nhiễm thì có thể dùng để nuôi kết hợp với phôi.

5. Nuôi phôi sau khi thụ tinh

Hai dạng môi trường nuôi phôi sau thụ tinh được thử nghiệm là SOF, 5% FBS [8] và SOF, 5% FBS kết hợp với các cụm tế bào ống dẫn trứng của trâu ở giai đoạn ngay sau rụng trứng. Năm trứng sau khi thụ tinh IVF được chuyển vào giọt nuôi 50 µl có các thành phần nêu trên. Trường hợp nuôi kết hợp với cụm tế bào thì cho vào mỗi giọt khoảng 200 cụm. Các giọt nuôi có phủ dầu được cân bằng nhiệt độ và pha khí trước khi chuyển trứng đã thụ tinh vào.

Việc nuôi phôi sau thụ tinh được duy trì ở mức áp suất O₂ thấp, có chế độ khí và nhiệt độ như khi nuôi thành thực trứng. Sau 4 ngày, phôi lại được chuyển sang môi trường mới, có thành phần tế bào tương tự, đã được cân bằng trong khí trộn trước khi chuyển ít nhất một giờ. Tình trạng phát triển của phôi được đánh giá dưới kính hiển vi lập thể vào lúc thay môi trường nuôi. Tỷ lệ phôi từ hai tế bào trở lên, phôi nang và phôi đầu được tính vào thời điểm kết thúc nuôi phôi vào ngày thứ 7.

II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Cả ba môi trường nuôi thành thực trứng đều cho kết quả thụ tinh IVF tạo phôi phát triển đến giai đoạn có phôi đầu và phôi nang. Nếu như môi trường có kết hợp với FBS và hoóc-môn và môi trường được bổ sung 20% dịch nang cho tỷ lệ tạo phôi từ 2 tế bào trở lên và tỷ lệ tạo phôi đầu phôi nang là như nhau thì môi trường được bổ sung dịch nang và hoóc-môn tỏ ra có ưu thế hơn cả về tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ tạo phôi đầu và phôi nang. Trong cả hai trường hợp, P đều nhỏ hơn 0,05 (bảng 3).

Bảng 3

Sự phát triển của phôi sau IVF

Môi trường	Số trứng	Số phôi ≥ 2 tế bào (%)	Số PD, PN	PD+PN/P2TB (%)	PD+PN/TS (%)
M1 (n=5)	500	281 (56,17,6) ^a	82	30,0+4,1 ^a	16,4+3,6 ^a
M2 (n=5)	450	258 (57,3+5,57) ^b	69	28,4+4,6 ^b	15,3+3,8 ^b
M3 (n=5)	450	318 (70,7+16,16) ^c	117	37,5+6,2 ^c	26,0+4,4 ^c

Ghi chú: PD: phôi đầu; PN: phôi nang; P2TB: phôi có từ 2 tế bào trở lên; TS: tổng số trứng.

c-b, P < 0,05; c-a, P < 0,05

Tỷ lệ tạo phôi đầu và phôi nang được cải thiện khi nuôi phôi sau thụ tinh trong môi trường SOF có bổ sung các cụm tế bào. Môi

trường SOF có bổ sung tế bào cũng làm cho tỷ lệ phôi nang phát triển trên tổng số phôi đầu và phôi nang sau 7 ngày nuôi cao hơn có ý nghĩa

so với môi trường SOF không bổ sung tế bào (Các trứng tham gia vào thí nghiệm này đều

được nuôi thành thực trong môi trường M2 được thụ tinh trong các điều kiện như nhau) (bảng 4).

Bảng 4

So sánh hai môi trường nuôi phôi sau thụ tinh

Thông số	SOF	SOF+tế bào
Số trứng đưa vào nuôi	450	450
Số phôi ≥ 2 tế bào (%)	258 (57,3 \pm 5,8)	263 (58,4 \pm 8,8)
Số phôi dâu, phôi nang (%)	69 (28,4 \pm 4,6)	109 (43,5 \pm 7,2)
Số phôi nang (%)	32 (44,4 \pm 2,9) ^a	71 (66,2 \pm 15,9) ^b

Ghi chú: b-a, P < 0,05

III. THẢO LUẬN

Hiện tượng sốc nhiệt được hạn chế tối đa nhờ việc hút trứng ngay sau khi buồng trứng được cắt rời khỏi cơ thể của con vật; trứng được chuyển ngay vào môi trường nuôi và cho vào bình ổn nhiệt xách tay (38°C).

Những tổn thương cơ học cũng được hạn chế và loại trừ bởi trước khi chuyển vào giọt nuôi thành thực, chỉ những tổ hợp trứng nào có lớp tế bào cumulus nguyên vẹn mới được chọn cho mục đích thí nghiệm. Tuy nhiên, việc đánh giá sự đồng nhất của chất nguyên sinh của tế bào trứng ở giai đoạn này là không khả dĩ. Để hạn chế các trứng kém chất lượng, trứng chỉ được thu từ các nang 2-8mm có dịch nang không bị đục.

Việc nuôi thành thực trứng trâu trong môi trường có bổ sung dịch nang [2] đã được tiến hành trong nhiều công trình IVF trâu. Dịch nang một mặt có thể thay thế huyết thanh, mặt khác không nhất thiết phải bổ sung hooc-môn. Dịch nang như vậy có thể thu dễ dàng từ những nang không thoái hoá có kích thước từ 8mm trở lên, được sử dụng hiệu quả cho IVF thay vì phải loại bỏ trong quá trình thu trứng. Dịch nang của buồng trứng trâu chứa sẵn đa dạng các hooc-môn như FSH, LH, estradiol, progesteron [9], các yếu tố phát triển chuyển hoá và các protein ức chế [10]. Một số yếu tố phát triển như IGF-2, EGF và TGF- α cũng tìm thấy trong dịch nang ở một số loài động vật có vú khác [1]. Sự hữu ích của dịch nang trâu có thể xuất phát từ các yếu tố kích thích này. Thực tế cho thấy các yếu tố phát triển tách ra từ nang trứng trợ giúp quá trình thành thực của trứng, thụ tinh và phát triển của phôi sau thụ tinh; các yếu tố này hoạt động như

đồng kích thích cùng với các gonadotropin lên trứng của không riêng trâu mà cả các loài thú khác [7]. Thêm vào đó, mRNA phiên mã cho thụ quan IGF-1 có biểu hiện trên tế bào cumulus, tế bào nang tổ hợp trứng trâu, trong khi IGF-1 và bản thân insulin làm tăng sự thành thực, tăng thụ tinh và tăng tỷ lệ phát triển thành phôi nang [11]. Các yếu tố có trong dịch nang như vậy, dưới tác dụng của FSH làm gia tăng nguyên phân, tăng tổng hợp protein và steroid. Việc thử nghiệm nuôi thành thực trứng trâu với từng yếu tố của dịch nang cũng cho các kết quả dương tính: EGF làm gia tăng độ tối phỏng của lớp cumulus, gia tăng độ thành thực của nhân và tỷ lệ thụ tinh [3]. Còn thêm IGF-2 làm tăng tỷ lệ tạo phôi cũng như tỷ lệ phôi đạt giai đoạn phát triển phôi nang [4]. Ngay từ bước thành thực trứng, tạo ra một trứng thành thực toàn vẹn có hoàn chỉnh các thành phần, không những chỉ đảm bảo cho quá trình thụ tinh, quá trình phát triển của phôi đến giai đoạn phôi nang mà cho toàn bộ quá trình phát triển hoàn thiện của một cá thể động vật. Việc sử dụng dịch nang cho quá trình thành thực trứng là kéo quá trình tạo phôi *in vitro* gần với quá trình tạo phôi *in vivo*.

Việc nuôi thành thực trứng trâu trong môi trường có bổ sung 20% dịch nang cho kết quả thụ tinh và kết quả phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang và phôi dâu tương tự như trường hợp dùng FBS có bổ sung eCG, hCG và estradiol; trong khi đó, môi trường có bổ sung dịch nang 20% kết hợp với hooc-môn có mức estradiol cao (3 μ g/ml) không những làm gia tăng tỷ lệ thụ tinh mà còn làm tăng tỷ lệ tạo phôi dâu và phôi nang. Điều này không loại trừ khả năng là tác dụng trực tiếp của các hooc-môn này lên sự thành thực của trứng, làm cho trứng có khả năng phát triển ở các giai đoạn tiếp theo. Chất

estradiol tương đối nhạy cảm đối với buồng trứng của trâu nói chung và đối với quá trình nuôi thành thực trứng trâu nói riêng. Khi kết hợp với FSH hoặc PMSG, Uoc et al. 1992 [13] cho thấy estradiol làm gia tăng số trứng rụng ở trâu có và không có chu kỳ. Trong điều kiện *in vitro*, estradiol làm gia tăng độ thành thực của trứng, gia tăng tỷ lệ hình thành cực cầu [12].

Thí nghiệm tạo phôi trâu bằng IVF này của chúng tôi một mặt khẳng định các điều kiện của phòng thí nghiệm là tương thích để tạo phôi thông qua việc sử dụng quy trình tạo phôi thông thường với việc nuôi thành thực trứng trâu trong TCM 199 có bổ sung 10% FBS và các hoóc-môn với kết quả là 16% phôi nang phôi dâu trên tổng số trứng nuôi và 30% trên số trứng thụ tinh. Thí nghiệm cũng cho thấy ưu thế của việc sử dụng dịch nang của buồng trứng trâu là rất rõ ràng. Có một nguồn dịch nang thuận tiện để nuôi thành thực trứng trâu, tuy nhiên để có hiệu quả tốt hơn, việc bổ sung các chất kích thích nhằm phát huy các yếu tố có ích và kìm hãm các yếu tố ức chế chắc chắn là mục đích nghiên cứu trong giai đoạn tới.

Việc nuôi phôi trâu sau thụ tinh cho đến nay vẫn còn là đối tượng của các công trình nghiên cứu. Chính giai đoạn này quyết định chất lượng phát triển của phôi ở các giai đoạn tiếp theo. Hiện tượng thai to quan sát thấy trong việc tạo phôi IVF ở bò [6] đặt câu hỏi về vấn đề dinh dưỡng của phôi, về việc bổ sung huyết thanh và các axit amin ở giai đoạn này. *In vivo*, các hợp tử hình thành trong ống dẫn trứng và chỉ chuyển vào tử cung từ ngày thứ 5, khi phôi đạt giai đoạn phát triển thành phôi dâu và phôi nang. Trong các công trình nghiên cứu đầu tiên, các tác giả đã sử dụng ống dẫn trứng động vật để nuôi phôi sau thụ tinh. Các phôi nang hoàn chỉnh trong ống dẫn trứng có khả năng chịu được quá trình bảo quản đông lạnh và giải đông, cho tỷ lệ cấy phôi cao và lần đầu tiên đã cho ra nghé là phôi được nuôi trong ống dẫn trứng của cừu sau thụ tinh [6]. Tuy quy trình này làm gia tăng chất lượng của phôi nhưng rất khó khăn khi áp dụng cho sản xuất phôi với số lượng lớn. Việc kết hợp môi trường SOF với cụm tế bào ống dẫn trứng trâu ở giai đoạn trâu vừa rụng trứng (suy đoán từ trạng thái của thể vàng) là giải pháp vừa kết hợp được yếu tố tế bào vừa kết hợp được yếu tố môi trường, lại hoàn toàn có thể thực hiện trong

phòng thí nghiệm. Các tế bào khai thác từ các ống dẫn trứng như vậy có thể bảo quản đông lạnh cũng như tái sử dụng.

Trong thí nghiệm, tỷ lệ tạo phôi nang trong môi trường có bổ sung tế bào cao hơn có ý nghĩa ($P < 0,05$) so với trường hợp nuôi trong môi trường SOF thông thường, trong khi tổng số phôi nang và phôi dâu cũng được cải thiện ($P < 0,05$) nếu nuôi phôi sau thụ tinh trong môi trường này.

IV. KẾT LUẬN

Nhìn chung lại, với việc sử dụng môi trường nuôi thành thực trứng trâu thông thường và môi trường cải tiến với 20% dịch nang của buồng trứng trâu cũng như thử nghiệm nuôi phôi sau khi thụ tinh trong môi trường SOF và SOF kết hợp với tế bào ống dẫn trứng, công trình tạo phôi bằng thụ tinh trong ống nghiệm của chúng tôi đã có các thông số: tỷ lệ tạo phôi đạt 28,4 đến 43,5 % phôi dâu và phôi nang. Việc dùng môi trường SOF có bổ sung các cụm tế bào ống dẫn trứng cho phép tỷ lệ phôi nang cấy nở có thể đạt tới 66,2 % tổng số phôi dâu và phôi nang. Việc nâng cao tỷ lệ thành thực của trứng và tỷ lệ tạo phôi nang như vậy vẫn còn là những thách thức nhằm đưa việc sản xuất phôi trâu *in vitro* áp dụng vào thực tế.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ackland J. F. et al., 1992: Physio. Rev., 72: 731-787.
2. Chauhan M. S. et al., 1997: Theriogenology, 48: 461-469.
3. Chauhan M. S. et al., 1999: Vet. Rec., 144: 266-267.
4. Chauhan M. S. et al., 1998: Vet. Rec., 142: 727-728.
5. Drost M., 1983: II Symposium on advanced Topics in Animal Reproduction: 167-179.
6. Galli C. et al., 2001: Theriogenology, 55: 1341-1357.
7. Gasparrini B., 2002: Theriogenology, 57: 237-258.
8. Holm P. et al., 1999: Theriogenology, 52: 683-700.

9. **Palta P. et al.**, 1996: Ind. J. Exp. Biol., 36: 768-774.
10. **Palta P. et al.**, 1996: Ind. J. Exp. Biol., 34: 606-608.
11. **Pawshe C. H. et al.**, 1998: Mol. Reprod. Dev., 49: 277-285.
12. **Ty L. V. et al.**, 2001: Theriogenology, 55: 406 abst
13. **Uoc N. T. et al.**, 1992: Theriogenology, 38: 471-478.

PRODUCTION BY IN VITRO FERTILIZATION OF VIETNAM SWAMP BUFFALO EMBRYOS.

LE VAN TY, HOANG NGHIA SON, NGUYEN MONG HUNG

SUMMARY

This study was undertaken in order to test the ability of replacement of the foetal bovine serum (FBS) supplemented with hormones by the buffalo follicular fluid (BFF) in the oocyte maturation medium and the effect of co-culture with oviduct cells on the subsequent embryo development in Vietnam swamp buffalo.

1400 cumulus enclosed oocytes (COC) were collected from the buffalo ovaries in slaughter-house in the way with minimize temperatural choc. COCs were randomtly cultured in three maturation medium varieties: TCM 199 supplemented with 10% FBS, 10 IU/ml eCG, 5 IU/ml hCG, 1 µg/ml estradiol (M1); TCM 199 with 20% buffalo follicular fluid (BFF) without hormones (M2) or TCM 199 with 20% BFF and the same level of eCG, hCG as M1 but 3 µg/ml estradiol (M3).

The effect of oviduct cells was evaluated by the embryo co-culture in two medium varieties: synthetic oviduct fluid (SOF) and SOF with oviduct cells after the maturation in the medium M2 and IVF.

No significal differences were observed in the maturation and the formation of morulas and blastocysts by using the routine maturation medium (M1) and TCM 199 supplemented with 20% BFF but the rate of formation of two-cell and more-cell embryos and the rate of total morula and blastocysts were clearly improved in the case of combined BFF and hormones (M3) (26.5% vs 16.3%, $P < 0.05$). The co-culture with oviduct cells not only improved the percentage of total embryos developed into morula blastocyst stage but also increased the rate of blastocyst formation in comparision with the medium without cells (66.2% vs 44.4%, $P < 0.05$).

This first try of in vitro embryo production in the swamp buffalo indicated the comparable rate (approximately 20%) of blastocysts can be obtained from total using oocytes.

Ngày nhận bài 5- 6-2004