

5. Chang Y.F., Liu T.Y. and Liu S.T. (2013). Arecoline inhibits and destabilizes agrin-induced acetylcholine receptor cluster formation in C2C12 myotubes. *Food and Chemical Toxicol.*, **60**: 391-96.
6. Conder G.A. and Campbell (1995). Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance. *Advances in Parasitology*, **35**: 1-84.
7. Deepak K., Sucheta S., S.R.P. Sinha, Sudha K., Manoj K. and S. Samantaray (2014). Evaluation of the anthelmintic activity of garlic (*Allium sativum*) and betel nut (*Areca catechu*) in pups naturally infected with hookworms. *Ind. J. Canine Practice*, **6**(2): 174-76.
8. Dhanraj M., Veerakumari L., Jeya R. and Ashwini (2018). Anthelmintic efficacy of ethanol extract of *Areca catechu* on the carbohydrate metabolism of *Cotylophoron cotylophorum*. *J. Entomol. Zoo. Studies*, **6**: 345-52.
9. Hotez P.J. and Pritchard D.I. (1995). Hookworm Infection. *Sci. Ame.*, **272**(6): 68-74.
10. Jain D., Maheshwari D. and Somani R. (2011). Anthelmintic potential of herbal drugs. *J. Adv. Drug Res.*, **1**: 965-67.
11. Jain S., Sharma P., Ghule S., Jain A. and Jain N. (2013). *In vivo* anti-inflammatory activity of *Tabernaemontana divaricata* leaf extract on male albino mice. *Chinese J. Nat. Med.*, **11**(5): 472-76.
12. Roy H., Chakraborty A., Bhanja S., Nayak B.S., Mishra S.R. and Ellaiah P. (2010). Preliminary phytochemical investigation and anthelmintic activity of *Acanthospermum hispidum* DCJ. *Pha.; Sci. Technol.*, **2**(5): 217-21.
13. Shaziya B. and Goyal P.K. (2012). Anthelmintic effect of Natural Plant (*Carica papaya*) extract against the Gastrointestinal nematode, *Ancylostoma caninum* in Mice. *ISCA J. Biological Sci.*, **1**(1): 2-6.
14. Traub R.J., Robertson I.D., Irwin P., Mencke N., Monis N. and Thompson R.C.A. (2003). Humans, dogs and parasite zoonoses - unravelling the relationship in a remote endemic community in northeast India using molecular tools. *Parasitol. Res.*, **90**: 156-57.
15. Whitworth J.A.G., Morgan D., Maude G.H., McNicholas A.M. and Taylor D.W. (1991). A field study of the effect of ivermectin on intestinal helminths in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**: 232-34.
16. Kopp S., Kotze A., McCarthy J. and Coleman G. (2007). High-level pyrantel resistance in the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Vet. Parasitol.*, **143**: 299-04.

TẠO DÊ SỮA SAANEN TỪ PHÔI *IN VIVO* BẰNG KỸ THUẬT CẤY CHUYỂN PHÔI

Nguyễn Khánh Vân^{1*}, Vũ Thị Thu Hương¹, Quán Xuân Hữu¹, Lê Văn Đạt¹, Phan Trung Hiếu¹, Nguyễn Thị Lệ Hương¹, Lưu Quang Minh² và Phạm Doãn Lâm³

Ngày nhận bài báo: 18/9/2022 - Ngày nhận bài phản biện: 28/9/2022

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 21/10/2022

TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là tạo được dê sữa Saanen từ phôi *in vivo* bằng kỹ thuật cấy chuyển phôi. Sử dụng phôi đầu/nang *in vivo* được thu bằng phương pháp phẫu thuật ở ngày thứ 6 sau phối giống từ dê sữa Saanen cho phôi được gây rụng trứng nhiều bằng FSH để cấy chuyển cho 5 dê nhận, số lượng phôi cấy dao động 2-3 phôi/dê nhận. Tỷ lệ dê nhận có chửa sau cấy chuyển phôi đạt 80% (4/5). Thời gian mang thai của dê nhận dao động từ 148-154 ngày. Tỷ lệ sinh dê con của dê nhận đạt 33,33% (4/12). Kết quả cho thấy phôi dê sữa Saanen *in vivo* ở giai đoạn phôi đầu/nang được cấy chuyển thành công vào dê nhận là dê Boer lai.

Từ khóa: cấy chuyển phôi, dê sữa Saanen, phôi *in vivo*.

ABSTRACT

Production of Saanen from *In vivo* embryos Goat through embryos transfer technique

The aim of this study was to produce Saanen dairy goats from embryos *in vivo* by embryo transfer technique. The *in vivo* produced embryos used were at morular/blastocyst stage and surgically collected on day 6 following insemination from Saanen goat donors superovulated

¹ Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào động vật - Viện Chăn nuôi

² Bộ Khoa học và Công nghệ

³ Viện Chăn nuôi

* Tác giả liên hệ: TS. Nguyễn Khánh Vân – GD. Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào động vật - Viện Chăn nuôi. Điện thoại: 0988447907; Email: cotihin@gmail.com

with FSH to transfer embryos to 5 recipients Boer goat, 2-3 embryos were transferred per doe. A pregnancy rate of 80% (4/5) was obtained following the transfer embryos. The overall gestation period recorded for the recipients range from 148 to 154 days. The kidding rate of the recipient does was 33,33% (4/12). These data demonstrate that *in vivo* Saanen embryos at morular/blastocyst stage were successfully transferred to the recipient Boer crossbred goats.

Key words: *transfer embryo, Saanen goat, in vivo embryo.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cấy chuyển phôi là một kỹ thuật hỗ trợ sinh sản giúp nhân nhanh các động vật nuôi có giá trị. Cấy chuyển phôi kết hợp với kỹ thuật gây rụng trứng nhiều, gây động dục đồng pha sẽ cho phép những động vật có giá trị di truyền cao sinh ra được thế hệ con non nhiều hơn so với tự nhiên. Việc kiểm soát được quá trình gây động dục đồng pha và rụng trứng là yếu tố đầu tiên đảm bảo cho sự thành công của quá trình cấy chuyển phôi.

Gây động dục đồng pha ở dê được thực hiện bằng cách kiểm soát giai đoạn thể vàng của chu kỳ động dục hoặc cung cấp progesterone ngoại sinh. Có hai cơ chế cơ bản gây động dục được sử dụng: (1) sử dụng prostaglandin hoặc các chất tương tự để rút ngắn thời gian tồn tại thể vàng hoặc gây phân hủy thể vàng từ đó tạo ra các sóng nang của chu kỳ động dục tiếp theo; (2) sử dụng progesterone ngoại sinh để kéo dài thời gian tồn tại thể vàng. Việc sử dụng một dụng cụ đặt âm đạo có chứa progesterone kết hợp với PGF 2α và GnRH được ứng dụng rộng rãi cho quá trình gây động dục đồng pha ở dê (Hasani và ctv, 2018; Nguyen Khanh Van và ctv, 2022). CIDR là dụng cụ đặt âm đạo có chứa progesterone được sử dụng phổ biến cho quá trình gây động dục đồng pha trên dê, bò, trâu.

Phôi được cấy chuyển vào dê bằng các phương pháp như: phẫu thuật, nội soi, tuy nhiên hầu hết các nhà nghiên cứu đều chọn phương pháp phẫu thuật để cấy chuyển phôi vào ống dẫn trứng hoặc sừng tử cung tùy thuộc vào giai đoạn phát triển của phôi. Cấy phôi bằng phương pháp phẫu thuật được thực hiện bằng cách phẫu thuật mở một đường giữa bụng, việc này cho phép kỹ thuật viên kiểm tra được buồng trứng để tìm thể

vàng, đánh giá được chính xác hiệu quả gây động dục đồng pha. Tuy nhiên, cấy phôi bằng phương pháp phẫu thuật đôi khi gây ra hiện tượng bị dính sau phẫu thuật, do đó cần hạn chế số lần thực hiện việc cấy phôi trên cùng một dê nhận.

Trong những năm gần đây, tại Việt Nam nhu cầu tiêu thụ các sản phẩm liên quan đến dê tăng nhanh. Việc nghiên cứu ứng dụng các kỹ thuật trong công nghệ sinh sản như gây rụng trứng nhiều (Nguyễn Khánh Vân và ctv, 2020; Nguyễn Khánh Vân và ctv, 2021), gây động dục đồng loạt (Nguyen Khanh Van và ctv, 2022), đông lạnh phôi dê (Nguyen Khanh Van và ctv, 2021) đã được thực hiện trên dê. Quy trình tạo dê con bằng kỹ thuật cấy chuyển phôi đã được thực hiện tại các nước đang phát triển. Tuy nhiên tại Việt Nam, chưa có báo cáo nào công bố về việc tạo được dê con bằng kỹ thuật cấy chuyển phôi. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá hiệu quả cấy chuyển phôi dê sữa Saanen tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

6 dê Boer lai 8-9 tháng, khối lượng 25-35kg.
Phôi dê sữa Saanen *in vivo*.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Gây động dục đồng pha

Quá trình gây động dục đồng pha được thực hiện như sau:

Ngày 0: đặt CIDR

Ngày 5: tiêm PGF 2α và rút CIDR

Ngày 6: tiêm Oestradiol Benzoat

Ngày 7: tiêm GnRH

Sau khi loại bỏ CIDR, kiểm tra động dục 3 lần/ngày (sáng, chiều, tối) cho tới khi phát hiện dê có biểu hiện động dục.

CHĂN NUÔI ĐỘNG VẬT VÀ CÁC VẤN ĐỀ KHÁC

2.2.2. Theo dõi biểu hiện động dục của dê

Theo dõi biểu hiện động dục của dê sau gây động dục đồng pha dựa trên các biểu hiện như vẩy đuôi, đi tiểu thường xuyên.

2.2.3. Phương pháp cấy chuyển phôi dê

Cấy chuyển phôi dê bằng phương pháp phẫu thuật, quá trình cấy chuyển phôi dê được thực hiện như sau:

Chọn dê làm dê nhận phôi sau gây động dục đồng pha.

Tiêm gây mê cho dê, cố định dê trên giá mổ sau đó làm sạch, vô trùng vị trí mổ trên bụng dê, tiêm phong bế Novocain xung quanh vị trí mổ.

Rạch khoảng 5cm giữa bụng dê, bộc lộ tử cung dê ra ngoài. Đếm số lượng thể vàng, số nang trứng chưa rụng để bước đầu đánh giá hiệu quả gây động dục đồng pha ở dê nhận.

Phôi được cấy vào sừng tử cung ở phía đầu nút ống dẫn trứng, để phù hợp với tuổi phôi (phôi dâu, phôi nang 6-7 ngày tuổi). Quá trình cấy phôi vào sừng tử cung được thực hiện như sau: chọn vị trí mở sừng tử cung phía đầu ống dẫn trứng, vị trí mở cần tránh các mạch máu để hạn chế sự xuất huyết, dùng kim 18G mở một lỗ nhỏ thông qua sừng tử cung, đưa dụng cụ cấy phôi vào sừng tử cung thông qua lỗ nhỏ đó và bơm phôi vào trong lòng tử cung.

Sau khi kết thúc quá trình cấy phôi, khâu vết mổ ở thành bụng dê theo 2 lớp: lớp phúc mạc (khâu bằng chỉ tụy tiêu) và lớp da thành bụng (khâu bằng chỉ không tiêu).

Tiêm kháng sinh hậu phẫu cho dê, theo dõi chặt chẽ biểu hiện động dục của dê ở các chu kỳ tiếp theo. Có thể khám thai bằng phương pháp siêu âm để chuẩn đoán có chửa sau 30 ngày kể từ khi kết thúc động dục.

2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excell 2010.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Dê Boer lai được kiểm tra nồng độ Progesterone huyết thanh tại thời điểm bắt

đầu gây động dục đồng pha, ngày bắt đầu có biểu hiện động dục và ngày có biểu hiện chịu đực để lựa chọn những dê đủ tiêu chuẩn sử dụng cho quá trình cấy chuyển phôi. Kết quả sau gây động dục đồng pha có 5/6 dê nhận đáp ứng được tiêu chí làm dê nhận phôi trong nghiên cứu này.

Nguồn gốc phôi là phôi dê sữa Saanen *in vivo*. Phôi được thu ở ngày thứ 6 từ dê cho phôi được phối giống sau gây rụng trứng nhiều bằng FSH và thu phôi bằng phương pháp phẫu thuật. Phôi sau khi thu được phân loại đánh giá chất lượng theo tiêu chuẩn của Stringfellow và Seidel (1999), chỉ sử dụng phôi dâu/nang loại A, B cho quá trình cấy chuyển phôi.

Theo dõi chặt chẽ biểu hiện động dục của dê nhận phôi sau cấy chuyển phôi ở chu kỳ tiếp theo. Nếu dê không động dục lại ở chu kỳ tiếp theo thì có thể siêu âm kiểm tra ở ngày 28-30 sau khi dê kết thúc động dục. Kết quả cấy chuyển phôi dê thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Cấy chuyển phôi/cá thể dê sữa Saanen

Chi tiêu	02	88	55	28	69
Thể vàng/dê nhận	1	2	3	2	1
Số phôi cấy chuyển	2	2	3	3	2
Có chửa	Có	Có	Có	Có	Không
Sảy thai	Có	Không	Không	Không	
TGMT, ngày	24	148	151	154	0
Số dê sinh ra	0	1	2	1	0

Kết quả cấy chuyển phôi dê của chúng tôi cho thấy có 4/5 dê nhận có chửa sau cấy chuyển phôi (Bảng 1). Tỷ lệ dê nhận phôi có chửa sau cấy chuyển phôi trong nghiên cứu này đạt 80%. Kết quả này của chúng tôi là cao hơn so với Fonseca và ctv (2014), nhưng lại thấp hơn so với kết quả của Lehloenya và ctv (2010). Theo Fonseca và ctv (2014), tỷ lệ có chửa sau cấy chuyển phôi dê Toggenburg đạt 50%; trong khi đó tỷ lệ có chửa sau cấy chuyển phôi dê của Lehloenya và ctv (2010) đạt 85,7%. Sự khác nhau về các kết quả nghiên cứu có thể là do: chất lượng dê nhận phôi, chất lượng và nguồn gốc phôi dê sử dụng cho cấy chuyển, điều kiện thí nghiệm...

Chất lượng dê nhận phôi là một trong những yếu tố có vai trò quan trọng mang lại

sự thành công của quá trình cấy chuyển phôi dê. Trong nghiên cứu của chúng tôi, bên cạnh việc lựa chọn dê nhận có nồng độ Progesterone huyết thanh tại thời điểm dê nhận bắt đầu có biểu hiện động dục phù hợp để nhận phôi, dê nhận phải có thời điểm chịu đực tương đồng với thời điểm phối giống của dê cho phôi, điều này đảm bảo cho sự đồng pha giữa dê nhận và dê cho phôi. Sự đồng pha giữa dê nhận phôi và tuổi phôi tại thời điểm cấy chuyển là một trong các yếu tố quan trọng mang lại sự thành công của quá trình cấy chuyển phôi.

Giai đoạn phát triển của phôi tại thời điểm cấy chuyển cũng là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến khả năng có chửa của dê nhận phôi. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng phôi dê ở giai đoạn phôi dâu và phôi nang cho quá trình cấy chuyển phôi. Trong hầu hết các nghiên cứu, phôi có thể được cấy chuyển ở giai đoạn phôi dâu và phôi nang (Giugnot và ctv, 2006), tuy nhiên Li và ctv (1990) lại cho rằng việc cấy chuyển phôi dê ở giai đoạn phôi nang hoặc phôi nang giãn nở sẽ nâng cao tỷ lệ có chửa của dê nhận phôi.

Kết quả bảng 1 cho thấy, có 01 dê nhận số hiệu 02 bị sảy thai ở ngày 24 sau cấy chuyển phôi, chiếm tỷ lệ 25% (1/4). Tỷ lệ dê sảy thai sau cấy chuyển phôi của chúng tôi là thấp hơn so với Lehloenya và ctv (2010), nhưng lại cao hơn Fonseca và ctv (2014). Theo Lehloenya và ctv (2010), Fonseca và ctv (2014) tỷ lệ dê sảy thai sau cấy chuyển phôi tương ứng là 33,33% (2/6) và 0% (0/3). Hiện tượng sảy thai sau cấy chuyển phôi là hiện tượng thường gặp ở các loài động vật. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến thai kỳ của con nhận sau cấy chuyển phôi như: chất lượng con nhận, chất lượng phôi được cấy chuyển, điều kiện chăm sóc nuôi dưỡng... Số lượng thể vàng của con nhận sau gây động dục đồng pha cũng là một trong các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng giữ thai của con nhận sau cấy chuyển phôi. Khi số lượng thể vàng ít sẽ làm giảm nồng độ Progesterone trong huyết thanh, qua đó ảnh hưởng đến sự an toàn của thai kỳ ở con nhận (Arashiro và ctv, 2010). Thông thường Progesterone trong huyết thanh sẽ thấp trước khi rụng trứng

và sẽ tăng lên khi cơ thể con cái mang thai. Progesterone trong huyết thanh có tác dụng làm dày lớp niêm mạc tử cung, kích thích các tuyến tiết ra chất dinh dưỡng để nuôi thai, duy trì một thai kỳ khỏe mạnh. Khi nồng độ Progesterone trong huyết thanh thấp đến một mức độ nào đó sẽ không còn đủ để duy trì độ dày lớp niêm mạc tử cung, qua đó sẽ làm gia tăng hiện tượng sảy thai. Điều này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi khi dê bị sảy thai sau cấy chuyển phôi là dê nhận chỉ có 01 thể vàng, các dê còn lại có số thể vàng dao động 2-3 thể vàng.



Hình 1. Dê con sinh ra từ cấy chuyển phôi

Thời gian mang thai (TGMT) của dê nhận hoàn thành thai kỳ trong nghiên cứu của chúng tôi dao động 148-154 ngày. Tổng số phôi sử dụng cho thí nghiệm cấy chuyển phôi dê trong nghiên cứu này là 12 phôi, tỷ lệ dê sinh ra sau cấy chuyển phôi trong nghiên cứu này đạt 33,33% (4/12) (Hình 1). Kết quả này là thấp hơn so với Lehloenya và ctv (2010); Fonseca và ctv (2014). Theo Lehloenya và ctv (2010); Fonseca và ctv (2014), tỷ lệ dê sinh ra sau cấy chuyển tương ứng đạt 35,7% (5/14) và 50% (3/6). Số lượng phôi cấy chuyển cho một dê nhận cũng là một trong các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả cấy chuyển phôi (Lehloenya và ctv, 2010). Số lượng phôi/dê nhận sử dụng trong thí nghiệm này dao động 2-3 phôi, trong khi đó Lehloenya và ctv (2010) chỉ sử dụng 2 phôi/dê nhận, Fonseca và ctv (2014) chỉ cấy chuyển tối đa 2 phôi/dê nhận. Kết quả của Fonseca và ctv (2014) cho thấy tất cả các dê được cấy chuyển 1 phôi/dê nhận đều không có chửa sau cấy chuyển phôi.

El-Gayar và Holtz (2005) cũng nhận thấy việc cấy chuyển nhiều hơn 2 phôi/dê nhận sẽ làm giảm tỷ lệ sống của phôi sau cấy chuyển. Đây có thể là nguyên nhân lý giải hiện tượng hai dê nhận trong nghiên cứu của chúng tôi mặc dù được cấy 3 phôi/dê nhận nhưng mỗi dê chỉ sinh được một dê con sau cấy chuyển phôi.

4. KẾT LUẬN

Cấy chuyển thành công phôi dê sữa Saanen ở giai đoạn phôi dâu/nang vào dê nhận là dê Boer lai với tỷ lệ có chửa đạt 80%, tỷ lệ dê sinh ra sau cấy chuyển phôi đạt 33,33%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện thông qua đề tài: “Nghiên cứu tạo dê sữa bằng kỹ thuật cấy chuyển phôi” từ nguồn kinh phí hỗ trợ hoạt động thường xuyên Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arashiro E.K., Fonseca J.F., Siqueira L.G.B., Fernandes C.A., Brandao F.Z., Oba E. and Viana J.H. (2010). Assessment of luteal function in goats by ultrasonographic image attribute analysis. *Small Rum. Res.*, **94**: 176-79.
2. El-Gayar M. and Holtz W. (2005). Transfer of sexed caprine blastocyst freshly collected or derived from cultured morulae. *Small Rum. Res.*, **57**: 151-56.
3. Fonseca J.F., Esteves L.V., Zambrini F.N., Brandão F.Z., Peixoto M.G.C.D., Verneque R.S., Siqueira L.G.B. and Viana J.H.M. (2014). Viable offspring after successful

non-surgical embryos transfer in goats. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, **2**(66): 613-16.

4. Guignot F., Bouttier A., Baril G., Salvetti P., Pignon P., Beckers J.F., Touze J.L., Cognie J., Traldi A.S., Cognie Y. and Mermillod P. (2006). Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenol.*, **66**: 1004-11.
5. Hasani N., Ebrahimi M., Ghasemi - Panahi B. and HosseinKhani A. (2018). Evaluating reproductive performance of three estrus synchronization protocols in Ghezel ewes. *Theriogenol.*, **122**: 9-13.
6. Lehloenya K.C. and Greyling J.P.C. (2010). Embryos transfer using cryopreservation Boer goat blastocyst. *South Afr. J. Anim.l Sci.*, **40**(Issue 5, Suppl 1): 446-50.
7. Li R., Cameron A.W.N., Batt P.A. and Trounson A.O. (1990). Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Rep. Fert. Dev.*, **2**: 345-50.
8. Stringfellow D.A. and Seidel S.M. (1999). *Manual of International embryos transfer Society.*
9. Nguyen Khanh Van, Vu Thi Thu Huong, Quan Xuan Huu, Phan Trung Hieu and Pham Doan Lan (2022). The effect of the estrous induction methods on the estrous synchronization in goats. *JAHST*, **279**: 81-87.
10. Nguyễn Khánh Vân, Quản Xuân Hữu, Nguyễn Thị Lệ Hương, Vũ Thị Thu Hương, Hoàng Thị Âu, Phạm Thị Kim Yến và Phạm Doãn Lâm (2020). Ảnh hưởng của phương pháp tiêm FSH (Follicle-stimulating hormone) đến hiệu quả gây rụng trứng nhiều trên dê sữa Saanen. *Tạp chí KHCN Việt Nam*, **62**(12): 45-49.
11. Nguyễn Khánh Vân, Quản Xuân Hữu, Phan Trung Hiếu và Phạm Doãn Lâm (2021). Ảnh hưởng của gây rụng trứng nhiều lặp lại đến khả năng rụng trứng và tạo phôi dê Saanen *in vivo*. *Tạp chí KHKT Chăn nuôi*, **267**: 53-58.
12. Nguyen Khanh Van, Vu Thi Thu Huong, Hoang Thi Au and Pham Doan Lan (2021). Influence of cryopreservation and developmental stages of embryos on Saanen goat embryos during cold storage Vietnam. *JAHST*, **268**: 35-39.