

## THỬ NGHIỆM CẤY TRUYỀN PHÔI BÒ ỨNG DỤNG KỸ THUẬT CỐ ĐỊNH THỜI GIAN CẤY PHÔI

Nguyễn Công Toàn<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Thanh<sup>1</sup>, Nguyễn Hoài Nam<sup>1</sup>, Nguyễn Đức Trường<sup>1</sup>, Ngô Thành Trung<sup>1</sup>,  
Takeshi Osawa<sup>2</sup> và Sĩ Thanh Long<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam; <sup>2</sup>Đại học Miyazaki, Nhật Bản

Tác giả liên hệ: Nguyễn Công Toàn. Tel: 0981044890. Email: toan.hua@gmail.com

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành với 20 bò cái nhận phôi được chọn lọc dựa theo các tiêu chuẩn của bò cái nhận phôi trong đó bao gồm 15 bò sữa và 5 bò thịt. Các bò cái nhận phôi được gây động dục, rụng trứng, tạo thể vàng đồng pha và cố định thời gian cấy truyền phôi bằng quy trình Ovsynch + CIDR. Tới ngày thứ 16 của quy trình Ovsynch + CIDR tiến hành cấy truyền phôi bằng phương pháp không phẫu thuật sử dụng súng cấy phôi thể hệ mới với 8 bò nhận phôi được cấy phôi tươi và 12 bò cái nhận phôi được cấy phôi đông lạnh. Sau khi cấy phôi bò cái nhận phôi được theo dõi, chẩn đoán có chửa bằng việc thông qua biểu hiện động dục trở lại, và dùng máy siêu âm trung bình 30 ngày và được siêu âm lại ở ngày thứ 45 sau khi cấy phôi. Kết quả về tỷ lệ có chửa ở bò cái nhận phôi trung bình là 50% (10/20) trong đó nhóm bò thịt có tỷ lệ chửa cao hơn với 60% (3/5) nhóm bò sữa là 46,7% (7/15), tuy nhiên sự chênh lệch này không có ý nghĩa thống kê ( $P>0,05$ ). Ngoài ra khi sử dụng phôi tươi cho cấy truyền thì cho tỷ lệ có chửa ở bò cái nhận phôi cao hơn sử dụng phôi đông lạnh (62,5% so với 41,7%), sự chênh lệch này có ý nghĩa thống kê ( $P<0,05$ ).

**Từ khóa:** Cấy truyền phôi, bò nhận phôi, phôi tươi, phôi đông lạnh, động dục đồng pha, cố định thời gian cấy phôi

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Cấy truyền phôi là một kỹ thuật hỗ trợ sinh sản thông qua đó làm tăng số bê con được sinh ra từ các bò cái có giá trị cao (Gabriel và cs., 2012). Trong đó bò cái nhận phôi đóng vai trò rất quan trọng đến thành công của kỹ thuật cấy truyền phôi. Để cấy truyền phôi cho bò cái nhận phôi một cách chủ động người ta cần gây động dục đồng pha cho bò cái nhận phôi. Có thể sử dụng nhiều công thức gây động dục đồng pha cho bò cái nhận phôi, đơn giản và tiết kiệm nhất là người ta sử dụng Prostaglandin (PG), tuy nhiên hiệu quả của phương pháp này không cao (Bó và cs., 2002). Công thức gây động dục đồng pha với sự kết hợp của Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) và Prostaglandin (PG) kết hợp với các loại vòng tằm progesterone/progestogen (P4) đã được thực hiện thành công trong việc điều khiển hoạt động của nang trứng và thể vàng và gây rụng trứng ở bò cái nhận phôi mà không cần theo dõi và phát hiện động dục, quy trình này được gọi là cố định thời gian cấy truyền phôi (tiếng Anh là fixed-time embryo transfer (FTET) (Baruselli và cs., 2000, 2001; Bó và cs., 2001, 2002).

Mục tiêu của nghiên cứu này là thử nghiệm công thức cố định thời gian cấy truyền phôi bằng kết hợp Gonadotropin (GnRH), Prostaglandin (PG) và vòng tằm progesterone đặt âm đạo bò cái nhận phôi để cấy truyền phôi bò *in vivo* cho bò cái nhận phôi mà không cần phát hiện động dục và đánh giá hiệu quả của phương pháp mới này.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Vật liệu nghiên cứu

Trong nghiên cứu này chúng tôi chọn ra 20 bò cái nhận phôi đủ tiêu chuẩn về sức khỏe, thể trạng và khả năng sinh sản theo các tiêu chuẩn của bò cái nhận phôi trong đó 15 bò sữa giống lai HF và 5 bò thịt giống lai Brahman.

Bò nhận phôi được nuôi theo phương thức nuôi nhốt trong chuồng, thức ăn bao gồm thức ăn thô xanh là các loại cỏ, thức ăn ủ chua và thức ăn tinh hỗn hợp chế biến sẵn và được cho uống

nước sạch tự do. Bò nhận phôi là bò sữa trong giai đoạn cho sữa thì được vắt 2 lần/ngày vào buổi sáng và chiều tối.

### Thời gian và địa điểm nghiên cứu

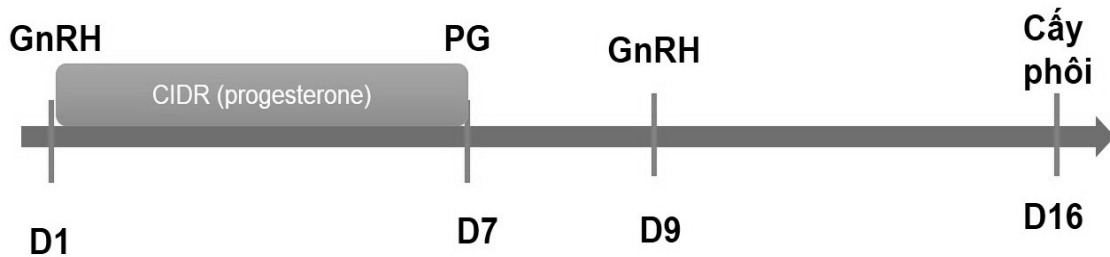
Thời gian nghiên cứu: Từ 08/2018 - 09/2019

Địa điểm nghiên cứu: Học viện Nông nghiệp Việt Nam và Trung tâm nghiên cứu Bò và Đồng cỏ Ba Vì, Hà Nội

### Phương pháp nghiên cứu

#### *Gây động dục đồng pha ở bò cái nhận phôi*

Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng quy trình Ovsynch+CIDR để gây rụng trứng đồng pha và cố định thời gian cấy phôi ở bò cái nhận phôi. Công thức Ovsynch+CIDR như bên dưới:



Hình 1. Quy trình gây động dục đồng pha và cấy truyền phôi cố định thời gian (FTET)

Đặt vòng tâm progesterone đặt âm đạo bò trong 7 ngày (Vòng CIDR tâm 1,38g progesterone do New Zealand sản xuất), 7h sáng của ngày đầu tiên đặt vòng đồng thời tiêm 200 $\mu$ g Gonadorelin (Ovurelin, Bayer của Đức sản xuất) với mục đích gây rụng trứng nang trứng trội hiện có trên buồng trứng để tạo thể vàng mới, đồng thời làm cho một đợt sóng nang mới xuất hiện trên buồng trứng của bò cái nhận phôi, đến 7h chiều của ngày thứ 7 chúng tôi cho tiến hành rút vòng CIDR (Zoetis, New Zealand sản xuất) từ âm đạo của bò cái nhận phôi ra đồng thời tiêm bắp 500 $\mu$ g Cloprostenol (Ovuprost, công ty Bayer sản xuất) đây là một dạng khác của Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  nhằm gây thoái hóa và tiêu biến thể vàng, làm cho hàm lượng progesterone trong máu bò cái nhận phôi đột ngột giảm xuống và mất đi trong máu kích thích bò cái nhận phôi động dục, thông thường bò cái sẽ động dục sau khi rút vòng progesterone 48-56 giờ, tới ngày thứ 9 của quy trình tiến hành tiêm 200 $\mu$ g Gonadorelin (Ovurelin, Bayer Đức sản xuất) để kích thích bò cái nhận phôi rụng trứng và ngày thứ 16 của quy trình thì tiến hành cấy truyền phôi.

#### *Cấy truyền phôi*

Cấy truyền phôi được tiến hành bằng phương pháp không phẫu thuật bằng súng cấy phôi thể hệ mới-súng cấy phôi sâu. Phôi bò được chứa trong cọng rạ. Trường hợp sử dụng phôi đông lạnh thì trước khi cấy phôi thì phải tiến hành giải đông phôi bằng nước ấm 30°C/10s. Sau đó nạp phôi vào súng cấy phôi và tiến hành cấy phôi, phôi được đưa vào sừng tử cung bên buồng trứng có thể vàng.

### **Chẩn đoán có thai ở bò cái nhận phôi sau khi cấy truyền phôi**

Trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành chẩn đoán bò cái nhận phôi có thai thông qua ba phương pháp sau:

Phương pháp theo dõi bò cái nhận phôi không động dục trở lại

Nếu sau khi cấy phôi khoảng trung bình là 14 ngày mà thấy bò cái xuất hiện động dục trở lại thì có nghĩa bò cái nhận phôi không có chửa, nếu bò cái không xuất hiện động dục trở lại thì có thể bò cái nhận phôi đã có chửa. Tuy nhiên, cần khám lại bằng phương pháp khám tay thông qua trực tràng sau đó 30-45 ngày, hoặc siêu âm ở 30-35 ngày để khẳng định chắc chắn.

Chẩn đoán thai bằng phương pháp dùng máy siêu âm

Chúng tôi chủ yếu sử dụng phương pháp siêu âm để chẩn đoán bò cái nhận phôi có thai ở ngày thứ 30 sau khi cấy phôi và siêu âm lại ở ngày thứ 45.

### **Xử lý số liệu**

Tất cả số liệu được ghi chép, lưu trữ và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013.

## **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Tiến hành gây động dục đồng pha cho 20 bò cái nhận phôi đủ tiêu chuẩn được chọn lọc trong đó có 15 bò sữa và 5 bò thịt bằng tổ hợp hormone sinh sản, bằng công nghệ tiên tiến thông qua sử dụng các tổ hợp hormone sinh sản đã cho phép cố định được thời gian cấy truyền phôi. Thông qua việc sử dụng các tổ hợp hormone người ta đã điều khiển và đồng bộ được hoạt động của buồng trứng, quá trình rụng trứng và hình thành thể vàng, vì vậy khi sử dụng tổ hợp hormone này thì không cần phải theo dõi, phát hiện bò cái nhận phôi động dục mà cứ thời gian đã xác định trong quy trình là tiến hành cấy truyền phôi. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng quy trình Ovsynch+CIDR để gây rụng trứng đồng pha và cố định thời gian cấy phôi ở bò cái nhận phôi.

Tất cả bò cái nhận phôi sau khi được xử lý hormone theo quy trình Ovsynch + CIDR sẽ được cấy phôi vào ngày thứ 16 của quy trình bằng phương pháp không phẫu thuật với phôi tươi và phôi đông lạnh được tạo ra bằng phương pháp *in vivo*, phôi bào được cấy vào sừng tử cung của bò cái bên phía buồng trứng có thể vàng. Trong tiểu dự án này chúng tôi tiến hành cấy truyền phôi cho tổng số 20 bò cái nhận phôi trong đó có 5 con bò thịt và 15 con bò sữa nhận phôi. Kết quả cấy truyền phôi bò được thể hiện ở Bảng 1 dưới đây:

Bảng 1. Kết quả cấy truyền phôi bò *in vivo* cho bò cái nhận phôi bằng phương pháp cố định thời gian cấy phôi (FTET)

	<b>Số bò được cấy phôi (con)</b>		<b>Tổng cộng</b>
	<b>Phôi tươi</b>	<b>Phôi đông lạnh</b>	
Bò sữa	5	10	15
Bò thịt	3	2	5
<b>Tổng cộng</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>20</b>

Sau khi cấy truyền phôi 14 ngày tiến hành theo dõi bò cái nhận phôi động dục, những bò cái nhận phôi xuất hiện động dục trở lại sau khi cấy phôi trung bình 14 ngày được xác định là không có chửa, những bò còn lại không xuất hiện động dục trở lại thì tiến hành chẩn đoán có

thai bằng siêu âm sau khi cấy truyền phôi từ 30-35 ngày và sau đó 2 tuần tiếp tục siêu âm lại. Kết quả về đánh giá mang thai ở bò cái nhận phôi được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 2. Kết quả tỷ lệ có chữa của bò cái nhận phôi sau khi cấy truyền

	Số bò được cấy phôi (con)	Số bò có chữa (con)	Tỷ lệ chữa (%)
Bò sữa	15	7	46,7 <sup>a</sup>
Bò thịt	5	3	60,0 <sup>a</sup>
Tổng cộng	20	10	50%

Qua Bảng 2 cho thấy tỷ lệ có chữa trung bình của bò cái nhận phôi sau khi cấy truyền là 50% trong đó nhóm bò thịt có tỷ lệ chữa trung bình cao hơn với 60% (3/5 bò có chữa) so với nhóm bò sữa với 46,7% (7/15 bò có chữa), tuy nhiên sự sai khác này không có ý nghĩa về mặt thống kê ( $P>0,05$ ).

Để đánh giá tỷ lệ có chữa của bò cái nhận phôi theo dạng phôi: phôi tươi hoặc phôi đông lạnh chúng tôi chia nhóm kết quả tỷ lệ có chữa theo dạng phôi. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Kết quả tỷ lệ có chữa của bò cái nhận phôi theo phôi tươi hoặc phôi đông lạnh

	Số bò có chữa (con)		Tỷ lệ có chữa (%)		Tỷ lệ có chữa trung bình (%)
	Phôi tươi	Phôi đông lạnh	Phôi tươi	Phôi đông lạnh	
Bò sữa (n=15)	3/5	4/10	60.0	40.0	46.7
Bò thịt (n=5)	2/3	1/2	66.7	50.0	60.0
Tổng cộng (n=20)	5	5	62.5 <sup>a</sup>	41.7 <sup>b</sup>	50.0

Qua Bảng 3 chúng ta thấy tỷ lệ có chữa của bò cái nhận phôi khi cấy bằng phôi tươi cao hơn khi cấy bằng phôi đông lạnh trong cả hai nhóm bò thịt và bò sữa với tỷ lệ chữa tương ứng là 62,5% và 41,7% và tỷ lệ này có sự chênh lệch có ý nghĩa về thống kê ( $P<0,05$ ), cụ thể nhóm bò sữa được cấy phôi tươi có tỷ lệ có chữa là 60,0% so với 40,0% với phôi đông lạnh, với nhóm bò thịt thì cấy phôi tươi cho tỷ lệ có chữa cao với 66,7% so với 50,0% khi cấy phôi đông lạnh. Điều này cho thấy nên cấy phôi bò bằng phôi tươi sẽ cho tỷ lệ có chữa cao hơn phôi đông lạnh. Tuy nhiên, để cấy được phôi tươi thì công tác gây động dục đồng pha ở bò cái nhận phôi phải thật sự tốt để đồng bộ hoạt động của buồng trứng và tử cung cũng như động dục của bò cái cho phôi phải trùng với bò cái nhận phôi.

Theo kết quả nghiên cứu của Hisashi và cs. (2017) tại Nhật Bản khi theo dõi trên 621 lần cấy phôi cho bò sữa Holstein và 527 lần cấy phôi cho bò đen Nhật Bản bằng phôi đông lạnh cho kết quả tỷ lệ có chữa dao động theo các tháng trong năm với trung bình ở bò sữa là 45,4% cao nhất khi cấy phôi vào tháng 4 (60,9%) và bò thịt giống Bò đen của Nhật Bản là 42,2% (cao nhất vào tháng 5 với 51,8% có chữa). Tỷ lệ có chữa ở bò nhận phôi trong nghiên cứu của chúng tôi đối với bò sữa Holstein thì thấp hơn 5,4% so với ở Nhật Bản tuy nhiên với bò thịt thì kết quả của chúng tôi cao hơn so với tỷ lệ có chữa trung bình khi cấy phôi bò đen Nhật Bản. Điều này có thể là do điều kiện về giống bò, thể trạng, dinh dưỡng, khí hậu ở hai nước có sự khác nhau. Đồng thời số lượng bò cái nhận phôi được cấy truyền trong nghiên cứu của tiểu dự án của chúng tôi ít hơn so với nghiên cứu tại Nhật Bản (20 bò so với 1.149 bò).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng khá tương đồng với kết quả nghiên cứu của tác giả Baruselli và cs. (2011) khi nghiên cứu về cấy truyền phôi đông lạnh cho 5.041 bò sữa Holstein cao sản tại Achantina thì cho kết quả tỷ lệ có chửa vào mùa mát (mùa thu và mùa đông) là 40,7% và vào mùa nóng (mùa xuân và mùa hạ) là 37,7%. Tác giả Siqueira và cs. (2009) khi nghiên cứu cấy truyền phôi bò cho bò nhận phôi là bò lai tại Brazil và dùng công thức cố định thời gian cấy truyền phôi sử dụng 2mg oestradiol benzoate tiêm cho bò cái nhận phôi và đặt vòng tâm progesterone CIDR (chứa 1,9g progesterone) vào ngày 0 của quy trình, ngày 5 tiêm 400 IU huyết thanh ngựa chửa, tới ngày 8 của quy trình thì tiêm Prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) đồng thời rút vòng, ngày thứ 9 tiêm 1mg estradiol benzoate (EB) và tới ngày thứ 17 thì cấy truyền phôi. Kết quả thu được tỷ lệ có chửa của bò cái nhận phôi với phôi *in vivo* là 58,8% và 31,0% với phôi *in vitro*. Tương tự như nghiên cứu của tác giả Siqueira và cs. (2009) thì nghiên cứu của Lagioia, J. và cs. (2016) khi so sánh kết quả cấy truyền phôi bằng phôi tươi và phôi đông lạnh với hai phương pháp là phát hiện động dục và cố định thời gian cấy truyền phôi cũng cho kết quả với phương pháp cố định thời gian cấy truyền phôi mà không cần phát hiện động dục cho tỷ lệ có chửa ở bò cái nhận phôi với phôi tươi là 59,6% và phôi đông lạnh là 49,0%. Tỷ lệ có chửa khi cấy phôi tươi giữa hai phương pháp là tương đương không có sự khác biệt (59,6% với cố định thời gian cấy phôi và 60,5% với phương pháp phát hiện động dục) tuy nhiên khi cấy phôi đông lạnh thì tỷ lệ có chửa có phần chênh lệch (49,0% với phương pháp cố định thời gian cấy phôi và 59,1% với phương pháp phát hiện động dục). Qua đây cho thấy với cấy phôi tươi thì sử dụng cố định thời gian cấy phôi vẫn mang lại hiệu quả cao, tuy nhiên với phôi đông lạnh thì phương pháp phát hiện động dục ở bò cái nhận phôi cho kết quả cao hơn là cố định thời gian cấy phôi, điều này có thể giải thích là phương pháp phát hiện động dục sau đó cấy phôi sau 7 ngày cho kết quả đồng pha chính xác hơn là cố định thời gian cấy phôi, vì phôi đông lạnh sức sống sẽ thấp hơn với phôi tươi vì vậy thời điểm cấy phôi chính xác rất ảnh hưởng rất lớn tới tỷ lệ có chửa của bò cái nhận phôi sau cấy truyền.

### KẾT LUẬN

Kết quả cấy truyền phôi bò *in vivo* cố định thời gian cấy truyền phôi cho thấy:

Tỷ lệ có chửa trung bình ở bò cái nhận phôi là 50% (10/20) trong đó tỷ lệ có chửa ở bò thịt là 60% (3/5) cao hơn tỷ lệ có chửa ở bò sữa là 46,7% (7/15).

Tỷ lệ có chửa của bò cái nhận phôi khi được cấy bằng phôi tươi với 62,5% (5/8) cao hơn cấy bằng phôi đông lạnh với 41,7% (5/12).

### LỜI CẢM ƠN

Trân trọng cảm ơn Dự án "Đẩy mạnh đổi mới sáng tạo thông qua nghiên cứu khoa học và công nghệ" – Dự án FIRST đã tài trợ kinh phí để nhóm nghiên cứu thuộc Bộ môn Ngoại Sản, Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam thực hiện thành công nghiên cứu này.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barusellia, P.S., Ferreira, R.M., Salesa, J.N.S., Gimenesa, L.U., Sá Filhoa, M.F., Martinsa, C.M., Rodriguesb, C.A. and Bó, G.A. 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* 76 (2011), pp. 1583–1593
- Hisashi Nabenishi, Fumiaki Sugino, Rui Konaka and Atusi Yamazaki. 2018. Conception rate of Holstein and Japanese Black cattle following embryo transfer in southwestern Japan. *Anim Sci J.* 2018; pp. 1–6
- Baruselli, P., Marques, M., Carvalho, N., Valentim, R., Berber, R., Carvalho Filho, A. and Madureira, E. 2000. Follicular dynamics and pregnancy rate in embryo recipient (*Bos taurus indicus* × *Bos taurus taurus*) treated with 'OvSynch' protocol for fixed-time embryo transfer. *Acta Sci. Vet.* 28, pp. 125-129

- Baruselli, P., Marques, M., Madureira, E., Costa Neto, W., Grandinetti, and Bó, G. 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. *Theriogenology* 55, p.157
- Bó, G., Tribulo, H., Caccia, M. and Tribulo, R. 2001. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. *Theriogenology* 55, pp. 357-360.
- Bó, G., Baruselli, P., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tribulo, R., Tribulo, H. and Mapletoft, R. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57, pp. 53–72
- Siqueira, L., Torres, C., Souza, E., Monteiro, P., Arashiro, K., Camargo, L., Fernandes, D. and Viana, J. 2009. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology* 72, pp. 949–958
- Lagioia, J., Panarace, M., Marfil, M., Basualdo, J., Gutierrez, J., Révora, M. and Medina, M. 2016. Pregnancy rates obtained after embryo transfer at fixed time of *in vivo*, IVF and cloned-derived embryos. *Reproduction, Fertility and Development Journal*: 231-232. Abstract
- Gabriel, A., Lucas Coelho Peres, Lucas, E., Cutaia, A., Danilo Pincinato, A., Pietro, S., Baruselli, C. and Mapletoft, R. J. 2012. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reproduction, Fertility and Development*, 24, pp. 272–277

## ABSTRACT

### Application of fixed-time embryo transfer technique in cattle

The study was conducted with 20 recipient cows which were selected according to the standards of recipient cows included 15 dairy cows and 5 beef cows. Recipient cows were estrus synchronization, ovulation, corpus luteum induced synchronization and fixed time embryo transfer using Ovsynch + CIDR protocol. Recipient cows were conducted non-surgical embryo transfer using a new generation embryo gun with 8 cows receiving fresh embryos and 12 cows receiving frozen embryos on day 16 of the Ovsynch + CIDR protocol. After embryo transfer, recipient cows were pregnancy diagnosed by observation of estrus at average 14 days after embryo transfer and ultrasonography at 30 and 45 days after embryo transfer. The results of pregnancy rates of recipient cows was 50% in average (10/20) and beef recipient cow group had pregnancy rate with 60% (3/5) higher than that of dairy recipient cow group with 46.7% (7/15) but not significantly ( $P > 0.05$ ). In addition, when using fresh embryos for transfer, the pregnancy rate in cows receiving embryos was higher significantly than using frozen embryos (62.5% compared to 41.7%) ( $P < 0.05$ ).

**Keywords:** *Embryo transfer, recipient cow, fresh embryo, frozen embryo, estrus synchronization, fixed-time embryo transfer*

Ngày nhận bài: 02/11/2019

Ngày phản biện đánh giá: 10/11/2019

Ngày chấp nhận đăng: 29/11/2019

**Người phản biện:** *TS. Nguyễn Văn Hạnh*