

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**

NGUYỄN THỊ TUYẾT NHUNG

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ
YẾU TỐ KỸ THUẬT SỬ DỤNG TINH TRÙNG ĐÃ XÁC ĐỊNH
TÍNH BIỆT CÁI ĐẾN KHẢ NĂNG SẢN XUẤT PHÔI IN VITRO
VÀ IN VIVO TRÊN BÒ HOLSTEIN FRIESIAN**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ
KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP**

THÁI NGUYÊN - 2015

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM**

NGUYỄN THỊ TUYẾT NHUNG

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ
YẾU TỐ KỸ THUẬT SỬ DỤNG TINH TRÙNG ĐÃ XÁC ĐỊNH
TÍNH BIỆT CÁI ĐẾN KHẢ NĂNG SẢN XUẤT PHÔI IN VITRO
VÀ IN VIVO TRÊN BÒ HOLSTEIN FRIESIAN**

Chuyên ngành: Chăn nuôi

Mã số: 60.62.01.05

**LUẬN VĂN THẠC
SĨ KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP**

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS. TS. Phan Đình Thắm 2. TS. Phan Lê Sơn

THÁI NGUYÊN - 2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng, số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa được sử dụng để bảo vệ một học vị nào.

Tôi xin cam đoan rằng, mọi sự giúp đỡ cho việc thực hiện luận văn này đã được ghi nhận, cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong luận văn đều đã được chỉ rõ nguồn gốc.

Thái Nguyên, ngày tháng năm 2015

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Tuyết Nhung

LỜI CẢM ƠN

Nhân dịp hoàn thành bản luận văn này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến Ban Giám Hiệu, Phòng quản lý đào tạo Sau đại học, Ban chủ nhiệm khoa Chăn nuôi thú y và Thầy giáo, Cô giáo Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên, không những đã giảng dạy và dìu dắt tôi trong quá trình học tập và hoàn thành luận văn. Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới Ban lãnh đạo Viện Chăn nuôi, cơ quan chủ quản nơi tôi công tác đã tạo điều kiện thuận lợi nhất để tôi hoàn thành quá trình học cũng như luận văn của mình.

Để hoàn thành luận văn này, tôi cũng xin gửi lời biết ơn sâu sắc tới thầy giáo, người hướng dẫn khoa học PGS.TS. Phan Đình Thắm và TS. Phan Lê Sơn đã tận tình giúp đỡ tôi trong suốt quá trình hoàn thành luận văn. Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn tới thầy giáo TS. Đào Đức Thà luôn động viên, dạy bảo, giúp đỡ và tạo điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành được luận văn này.

Xin cảm ơn sự giúp đỡ của các Cô, Chú, Anh, Chị, Em trong Bộ môn Sinh lý, Sinh sản và Tập tính vật nuôi đã tạo điều kiện, giúp đỡ tôi trong quá trình công tác và học tập.

Hà Nội, ngày tháng năm 2015

Tác giả luận văn

Nguyễn Thị Tuyết Nhung

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH ẢNH	viii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Buồng trứng bò.....	3
1.1.1. Cấu tạo buồng trứng.....	3
1.1.2. Chức năng của buồng trứng.....	4
1.1.3. Chu kỳ của buồng trứng.....	5
1.2. Nang trứng bò.....	6
1.2.1. Sự hình thành nang trứng bò.....	6
1.2.2. Chức năng của nang trứng	7
1.3. Tế bào trứng bò	8
1.3.1. Sự hình thành phát triển tế bào trứng.....	8
1.3.2. Cấu tạo tế bào trứng.....	9
1.3.3. Cơ chế thần kinh và thể dịch điều khiển sự phát triển của noãn nang	10
1.4. Tinh trùng.....	12
1.4.1. Đặc điểm sinh lý và cấu tạo của tinh trùng.....	12
1.4.2. Các phương pháp xác định giới tính tinh trùng	13
1.4.3. Cơ sở xác định giới tính tinh trùng bằng phương pháp dòng chảy tế bào (flow cytometric sexing).....	16
1.5. Sản xuất phôi in vitro	17
1.5.1. Hoạt hóa tinh trùng.....	18

1.5.2. Quá trình thụ tinh.....	20
1.5.3. Một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thụ tinh in vitro.....	21
1.5.4. Sự phát triển của phôi.....	22
1.6. Sản xuất phôi in vivo.....	24
1.7. Tình hình nghiên cứu trong và ngoài nước	25
CHƯƠNG 2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	27
2.1. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu.....	27
2.1.1. Đối tượng nghiên cứu.....	27
2.1.2. Phạm vi nghiên cứu	27
2.2. Nội dung nghiên cứu	27
2.2.1. Nội dung 1: Nghiên cứu sự ảnh hưởng của mật độ tinh trùng đã xác định tính biệt cái đến khả năng sản xuất phôi cái in vitro.	27
2.2.2. Nội dung 2: Ảnh hưởng của thời gian phối tinh trùng đã xác định tính biệt cái đến khả năng sản xuất phôi cái in vivo.....	28
2.2.3. Nội dung 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của số liều tinh trùng đã xác định tính biệt cái đến khả năng sản xuất phôi cái in vivo.	28
2.2.4. Nội dung 4: Nghiên cứu ảnh hưởng của vị trí bơm tinh trùng đã xác định tính biệt cái đến khả năng sản xuất phôi cái in vivo.....	28
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	29
2.3.1. Phương pháp sản xuất phôi in vitro.....	29
2.3.2. Phương pháp sản xuất phôi in vivo	32
2.3.3. Phương pháp xử lý số liệu.....	34
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	35
3.1. Ảnh hưởng của mật độ tinh trùng đã xác định tính biệt cái đến khả năng sản xuất phôi cái in vitro.	35
3.1.1. Thu tế bào trứng.....	35
3.1.2. Chất lượng tế bào trứng.....	37

3.1.3. Hợp tử phân chia.....	39
3.1.4. Đánh giá kết quả phôi dâu và phôi nang thu được.....	41
3.2. Ảnh hưởng của thời gian phôi tinh trùng đã xác định tính biệt cái đến khả năng sản xuất phôi cái in vivo.....	45
3.2.1. Phản ứng của bò được gây rụng trứng nhiều.....	45
3.2.2. Kết quả phôi thu được.....	47
3.2.3. Đánh giá chất lượng phôi.....	48
3.3. Ảnh hưởng của số liều tinh trùng đã xác định tính biệt cái đến khả năng sản xuất phôi cái in vivo.....	50
3.3.1. Phản ứng của bò được gây rụng trứng nhiều.....	51
3.3.2. Kết quả phôi thu được.....	53
3.3.3. Đánh giá chất lượng phôi.....	53
3.4. Ảnh hưởng của vị trí bơm tinh trùng đã xác định tính biệt cái đến khả năng sản xuất phôi cái in vivo.....	55
3.4.1. Số lượng thể vàng thu được.....	56
3.4.2. Kết quả phôi thu được.....	57
3.4.3. Đánh giá chất lượng phôi.....	58
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	61
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	62
PHỤ LỤC.....	68

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

BSA	: Bovine Serum Albumin
FCS	: Foetal Calf serum
FSH	: Follicle Stimulating Hormone
GnRH	: Gonadotropin Releasing Hormone
HEPES	: N-(2 Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HF	: Holstein Friesian
LH	: Luteinizing Hormone
LTH	: Luteo Tropic Hormone
PRH	: Prolactin Releasing Hormone
MEM	: Minimum Essential Medium
PGF _{2α}	: Prostaglandin F _{2α}
SOF	: Synthetic oviduct fluid
TCM-199	: Tissue culture medium 199
PCR	: Polymerase chain reaction
NST	: Nhiễm sắc thể

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1: Số lượng tế bào trứng thu được.....	35
Bảng 3.2: Chất lượng tế bào trứng theo mức độ từ tốt đến xấu.....	37
Bảng 3.3: Hợp tử thu được sau khi thụ tinh.....	39
Bảng 3.4: Phôi dâu và phôi nang thu được sau khi thụ tinh và nuôi phôi in vitro 7 ngày	42
Bảng 3.5: Tỷ lệ bò động dục, tỷ lệ bò được phôi giống và số lượng thể vàng thu được	45
Bảng 3.6: Số lượng phôi dâu và phôi nang thu được.....	47
Bảng 3.7: Phôi đủ tiêu chuẩn cấy (Loại A, B) và phôi không đủ tiêu chuẩn cấy (Loại C, D)	49
Bảng 3.8: Tỷ lệ bò động dục, tỷ lệ bò được phôi giống và số lượng thể vàng thu được	51
Bảng 3.9: Số lượng phôi thu được khi phôi bò được gây rụng trứng nhiều một liều tinh và 2 liều tinh.....	53
Bảng 3.10: Phôi đủ tiêu chuẩn cấy (Loại A, B) và phôi không đủ tiêu chuẩn cấy loại C, D).....	54
Bảng 3.11: Số lượng thể vàng thu được tại thời điểm thu phôi.....	56
Bảng 3.12: Số lượng phôi thu được	57
Bảng 3.13: Phôi đủ tiêu chuẩn cấy (Loại A, B) và phôi không đủ tiêu chuẩn cấy (Loại C, D)	59

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1: Cấu tạo của buồng trứng	3
Hình 1.2: Sự biến đổi hàm lượng hormone trong chu kỳ động dục ở bò	11
Hình 1.3: Sơ lược hệ thống xác định giới tính tinh trùng.	17
Hình 1.4: Các giai đoạn phát triển của phôi.....	23
Hình 2.1: Phác đồ gây rụng trứng nhiều	33
Hình 3.1: Thu tế bào trứng bằng phương pháp chọc – hút	36
Hình 3.2: Tế bào trứng	38
Hình 3.3: Hợp tử phân chia	39
Hình 3.4: Biểu đồ đánh giá bình quân số lượng hợp tử phân chia/buồng trứng giữa mật độ tinh trùng	40
Hình 3.5: Đánh giá chất lượng hợp tử phân chia trên kính hiển vi.....	42
Hình 3.6: Phôi thu được.....	43
Hình 3.7: Biểu đồ đánh giá bình quân số lượng phôi đủ tiêu chuẩn cấy/buồng trứng giữa mật độ tinh trùng.	44
Hình 3.8: Biểu đồ đánh giá bình quân số lượng phôi đủ tiêu chuẩn cấy/bò/làn giữa 3 mức độ thời gian phối giống	50
Hình 3.9: Buồng trứng bò sau khi thu phôi (ngày thứ 7 sau khi động dục).....	52
Hình 3.10: Biểu đồ đánh giá bình quân số lượng phôi đủ tiêu chuẩn cấy/bò/làn khi phối giống cho bò nhận phôi bằng 1 liều tinh và 2 liều tinh	55
Hình 3.11: Vị trí bơm tinh vào sừng tử cung	57
Hình 3.12: Biểu đồ đánh giá bình quân số lượng phôi đủ tiêu chuẩn cấy/bò/làn khi bơm tinh vào thân tử cung và sừng tử cung.....	60