

Ảnh hưởng của môi trường nuôi trứng, nuôi phôi lên sự hình thành và phát triển phôi bò sữa cao sản

Nguyễn Thị Hương*, Quản Xuân Hữu, Nguyễn Khánh Vân, Đỗ Văn Hương, Vũ Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Lệ Hương

Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi

Ngày nhận bài 1.6.2015, ngày chuyển phản biện 12.6.2015, ngày nhận phản biện 7.7.2015, ngày chấp nhận đăng 10.7.2015

Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi thành thực và môi trường nuôi phôi lên hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*. Nguồn tế bào trứng sử dụng cho các thí nghiệm thu từ bò sống bằng phương pháp siêu âm; trong đó số tế bào trứng loại A, B đạt 7,2 tế bào trứng/buồng trứng. Tỷ lệ tế bào trứng thành thực, tế bào trứng phân chia, phôi dâu, phôi nang và phôi nang thoát màng của tế bào trứng nuôi thành thực *in vitro* trong môi trường TCM 199 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH tương ứng là 89,31; 90,14; 47,65; 23,44 và 3,9%, cao hơn so với tế bào trứng nuôi trong các môi trường TCM 199 + 20% FCS hoặc Ham's F10 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH hoặc Ham's F10 + 20% FCS ($p < 0,05$). Nuôi thành thực tế bào trứng bò trong môi trường TCM 199 + FCS + 5 µg/ml FSH và nuôi phôi sau thụ tinh trong môi trường SOFaa + 5% FCS cho hiệu quả tạo phôi bò *in vitro* cao hơn so với nuôi phôi trong môi trường CR1aa + 5% FCS. Mặc dù không có sự khác biệt về tỷ lệ tế bào trứng phân chia khi nuôi trong môi trường SOFaa và CR1aa nhưng tỷ lệ tạo phôi dâu, phôi nang, phôi nang thoát màng trong môi trường SOFaa cao hơn so với môi trường CR1aa (tương ứng là 59,72; 35,42 và 15,27% ở SOFaa và 47,65; 23,44 và 3,9% ở CR1aa). Kết quả nghiên cứu đã chỉ ra rằng, việc sử dụng môi trường nuôi thành thực *in vitro* TCM 199 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH và môi trường nuôi phôi SOFaa có bổ sung 5% FCS mang lại hiệu quả cao cho quá trình tạo phôi bò *in vitro* tại Việt Nam.

Từ khóa: bò cao sản, phôi, trứng thành thực.

Chỉ số phân loại 4.2

Đặt vấn đề

Ngày nay, cùng với sự phát triển của khoa học và công nghệ, một kỹ thuật mới đã được sử dụng thay thế cho bước gây rụng trứng nhiều trong công nghệ cấy truyền phôi, đó là kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm. Kỹ thuật này giúp người chăn nuôi rút ngắn được khoảng cách thế hệ, gia tăng số lượng cá thể trong một thế hệ lên rất nhiều lần. Theo Erickson và cs (1966), mỗi buồng trứng bò trưởng thành có khoảng 70.000 nang trứng nguyên thủy, tuy nhiên bò là động vật đơn thai nên mỗi lần chỉ có một trứng chín rụng, do đó số lượng con sinh ra trong vòng đời của một bò cái là vô cùng nhỏ so với tiềm năng sẵn có của nó [1]. Để khai thác triệt để nguồn tiềm năng này, Pieterse và cs (1988) đã nghiên cứu và công bố phương pháp thu tế bào trứng từ gia súc sống với sự hỗ trợ của hệ thống siêu âm qua âm đạo (OPU) [2]. Tại Việt Nam, Nguyễn Văn Lý và cs (2007) đã nghiên cứu và báo cáo thành

công trong việc sử dụng phương pháp này để thu trứng trên bò sống. Theo báo cáo, tác giả đã thu được trung bình 3,98 tế bào trứng/buồng trứng, tỷ lệ thu trứng là 71,03% [3].

Siêu âm thu tế bào trứng qua âm đạo là một kỹ thuật nhằm thu tế bào trứng chưa thành thực từ con cho còn sống. Tạo phôi trong ống nghiệm từ những con cho còn sống là một kỹ thuật rất linh hoạt bởi nó có thể áp dụng cho những con cho ở tất cả các giai đoạn tuổi, từ những con bê 2 tháng tuổi đến những con bò già. Kỹ thuật OPU có thể áp dụng cho những con bò cận sữa hay đang vắt sữa và thậm chí ở giai đoạn có chữa tháng thứ 3 hay thứ 4 [4]. Ưu điểm của kỹ thuật này là không làm ảnh hưởng tới trạng thái sinh lý của con cho bởi vì nó không đòi hỏi sự kích thích của hormone. OPU thường được áp dụng để thu tế bào trứng với tần suất 2 lần một tuần. Như vậy trong thời gian ngắn có thể tạo ra được nhiều phôi bằng cách cho trứng thụ

*Tác giả chính: Email: giadinhmun@gmail.com

THE EFFECTS OF CULTURE MEDIUM ON IN VITRO OOCYTE MATURATION AND EMBRYO DEVELOPMENT OF HIGH YIELD COW

Summary

The purpose of this study is to assess the influences of maturation and embryo culture media on the production of *in vitro* bovine embryos. Oocytes used in this study have been collected from live cattle by ultrasound method, in which the A, B oocytes have been estimated about 7.2 oocytes per ovary. Percentage of matured oocytes, cleavage, morula, blastocyst and hatched embryos produced from oocytes cultured in maturation medium including TCM 199 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH have been 89.31, 90.14, 47.65, 23.44 and 3.9% respectively, which are significantly higher than those produced from oocytes in TCM 199 + 20% FCS or Ham's F10 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH or Ham's F10 + 20% FCS ($p < 0.05$). The combination of oocytes matured in TCM 199 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH and embryos cultured in SOFaa + 5% FCS has resulted in more effective production of *in vitro* bovine embryos than embryos cultured in CR1aa + 5% FCS. There was no difference in the proportion of cleavage between oocytes cultured in SOFaa (90%) and in CR1aa (90.14%). However, the rates of morula, blastocyst, and hatched embryos produced in SOFaa medium (59.72, 35.42 and 15.27% respectively) have been significantly higher than those produced in CR1aa medium (47.65, 23.44 and 3.9% respectively). This study has demonstrated that using TCM 199 + 10% FCS + 5 µg/ml FSH for oocyte maturation combined with SOFaa medium supplemented with 5% FCS for embryo culture could get more *in vitro* bovine embryos.

Keywords: bovine oocyte, embryo, high yield cow, maturation.

Classification number 4.2

tinh với tinh của những con đực giống mong muốn. Theo Merton và cs (2003), việc áp dụng kỹ thuật siêu âm thu tế bào trứng bò sữa kết hợp với tạo phôi *in vitro* mỗi năm có thể thu được 200 phôi/bò, cao hơn rất nhiều so với kết quả 50 phôi/bò/năm của kỹ thuật gây rụng trứng nhiều [5]. Để thu được phôi bò *in vitro* có chất lượng tốt, chúng tôi tiến hành so sánh một số môi trường nuôi trứng và nuôi phôi *in vitro* khác nhau trong điều kiện nghiên cứu của Việt Nam để tìm ra môi trường nuôi phù hợp nhất.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Bò dùng để siêu âm hút tế bào trứng là 4 bò sữa cao sản có năng suất sữa > 5.000 lít/chu kỳ.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp siêu âm hút tế bào trứng: quy trình siêu âm, hút tế bào trứng trên bò sữa được áp dụng dựa trên nghiên cứu của Nguyễn Văn Lý và cs (2007) [3].

Đánh giá chất lượng tế bào trứng: tất cả các tế bào trứng sau khi tìm được được tiến hành đánh giá phân loại trên kính hiển vi soi nổi theo phương pháp của Zeron và cs (2001) [6].

Nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng: tế bào trứng loại A, B được nuôi thành thực trong 4 môi trường (TCM 199 + 10% FCS + FSH; TCM 199 + 20% FCS; Ham's F10 + 10% FCS + FSH và Ham's F10 + 20% FCS, trong đó FSH bổ sung 50 µg FSH cho 10 ml môi trường) theo quy trình của Saito và cs (1995) [7]. Hoạt hóa tinh trùng được thực hiện theo quy trình của Saito và cs (1995) [7], trong môi trường BO (Bracket and Oliphant, 1975) [8].

Nuôi phôi *in vitro*: sau khi thụ tinh, các hợp tử giả định được nuôi trong 2 môi trường (SOFaa + 5% FCS và CR1aa + 5% FCS) theo quy trình của Saito và cs (1995) [7].

Đánh giá chất lượng phôi dâu và phôi nang: việc đánh giá chất lượng phôi được thực hiện theo Mapletoft và Bos (2013) [9], dựa trên tiêu chí đánh giá của FAO.

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Excell, sự khác nhau có ý nghĩa được kiểm tra bằng χ^2 sử dụng

hàm CHITEST.

Kết quả và thảo luận

Kết quả thu tế bào trứng bằng siêu âm trên bò sữa cao sản

Nhóm nghiên cứu thu được 1.530 tế bào trứng từ bò sống bằng phương pháp siêu âm với tần suất 2 lần/tuần; trung bình thu được 8,5 tế bào trứng/buồng trứng bò, trong đó tỷ lệ tế bào trứng loại A, B đạt 84,64% (tương đương với 7,2 tế bào trứng loại A, B/buồng trứng) (bảng 1). Kết quả của chúng tôi phù hợp với báo cáo của Phan Lê Sơn (2013) khi tác giả này nghiên cứu ảnh hưởng của tần suất siêu âm tới số lượng tế bào trứng bò thu được. Theo Phan Lê Sơn (2013), tần suất siêu âm 1/2 tuần 1 lần mang lại hiệu quả cao nhất (thu được 8,56 tế bào trứng/buồng trứng), trong đó tế bào trứng loại A là 4 và tế bào trứng loại B là 4,11 [4].

Bảng 1: kết quả thu tế bào trứng bằng siêu âm trên bò sống

Số ca thu trứng	Số tế bào trứng thu được	Số tế bào trứng/buồng trứng	Số tế bào trứng loại A, B thu được	Số tế bào trứng A, B/buồng trứng
n	n	M±SE	n	%±SE
180	1.530	8,5±0,36	1.295	84,64±0,42

Ảnh hưởng của môi trường nuôi trứng đến hiệu quả thành thực in vitro của tế bào trứng bò

Quá trình thành thực nhân tế bào trứng gồm các giai đoạn phát triển chính: kỳ đầu I, tiền kỳ giữa I, kỳ giữa I, kỳ sau I, kỳ cuối I và thành thực nhân. Kỳ cuối I xảy ra khi một bộ nhiễm sắc thể (NST) được tách ra trong thể cực I (giai đoạn này diễn ra rất nhanh), sau đó sẽ hình thành eo thắt tách rời thể cực I ra khỏi tế bào trứng. Tế bào trứng chứa bộ NST đơn bội ở trạng thái kếp dừng ở kỳ giữa giảm phân II sẽ trở thành tế bào trứng thành thực. Như vậy sản phẩm của phân bào giảm nhiễm I là tế bào trứng thứ cấp (noãn bào II) và thể cực thứ nhất nằm ở xoang quanh noãn phía bên trong màng sáng. Do đó tiêu chí đánh giá sự thành thực của trứng dựa trên sự xuất hiện của thể cực thứ nhất là rất chính xác (hình 1). Sau khi nuôi thành thực tế bào trứng, chúng tôi loại bỏ hoàn toàn lớp tế bào nang (cumulus) bao xung quanh tế bào trứng để quan sát thể cực thứ nhất, qua đó đánh giá sự thành thực của tế bào trứng. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.



Hình 1: tế bào trứng bò được nuôi thành thực in vitro với sự xuất hiện thể cực thứ nhất

Bảng 2: ảnh hưởng của môi trường nuôi in vitro tới sự thành thực tế bào trứng bò

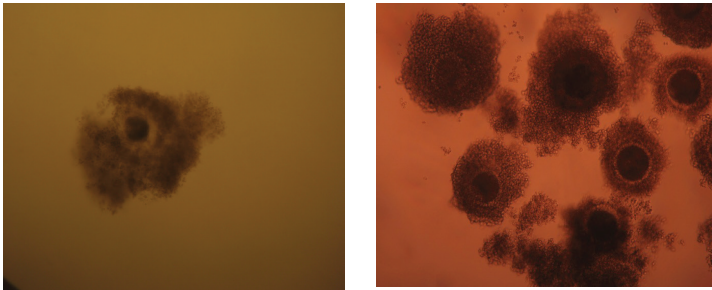
Môi trường	Số tế bào trứng nuôi	Số tế bào trứng thành thực	Tỷ lệ tế bào trứng thành thực
	N	n	%±SE
TCM 199 + FSH + FCS	131	117	89,31±4,15 ^a
TCM 199 + FCS	147	100	68,05±2,28 ^b
Ham F10 + FSH + FCS	157	121	77,07±1,94 ^b
Ham F10 + FCS	180	117	65±2,63 ^c

Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$)

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng bò thành thực in vitro trong bốn loại môi trường nuôi dao động từ 65 đến 89,31%. Kết quả này cao hơn so với Nguyễn Văn Lý (2006) [10], (65,61%); Nguyễn Hữu Đức và cs (2003) [11], (76,83%); Yang và cs (1998) [12], (65,61%); Otoi và cs (1997) [13], (77,23%). Sự khác nhau về các kết quả nghiên cứu là do nguồn gốc và chất lượng tế bào trứng. Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng tế bào trứng thu từ bò sống bằng phương pháp siêu âm hút tế bào trứng, trong khi đó các tác giả trên đều sử dụng nguồn tế bào trứng thu từ buồng trứng ở lò mổ. Tế bào trứng thu từ buồng trứng bò lò mổ thường có chất lượng kém hơn so với tế bào trứng bò thu từ bò sống.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tế bào trứng bò khi được nuôi thành thực in vitro trong môi trường TCM 199 và Ham's F10 có bổ sung FSH cho tỷ lệ thành thực cao hơn so với môi trường TCM 199 và Ham's F10 không có FSH. Kết quả này là phù hợp với báo cáo của Neglia và cs (2001) (87% và 76%) [14]. Các

tác giả này cũng cho rằng việc sử dụng kết hợp FCS và hormone trong môi trường nuôi thành thực sẽ làm tăng tỷ lệ thành thực của tế bào trứng bò. Điều đó cho thấy, FSH có tác động tích cực đến quá trình thành thực *in vitro* của tế bào trứng. Quá trình thành thực của trứng chịu tác động mạnh mẽ của lớp tế bào nang bao xung quanh, bởi vì các tế bào nang chính là cầu nối trao đổi giữa tế bào trứng và môi trường nuôi trong quá trình nuôi thành thực *in vitro*. Sự có mặt của FSH trong môi trường nuôi thành thực sẽ làm tăng quá trình giãn nở của lớp tế bào nang, kích thích quá trình thành thực nhân của tế bào trứng, qua đó sẽ làm tăng tỷ lệ tế bào trứng thành thực sau nuôi *in vitro* (hình 2).



Trứng nuôi trong môi trường có FSH Trứng nuôi trong môi trường không có FSH
Hình 2: trứng sau khi nuôi thành thực

Kết quả thu được cho thấy, môi trường TCM 199 nâng cao được hiệu quả nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng bò hơn môi trường Ham's F10 khi bổ sung FCS hoặc cùng bổ sung FCS và FSH (bảng 2). Điều đó cho thấy, TCM 199 là môi trường phù hợp hơn Ham's F10 trong nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng bò. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ tế bào trứng bò thành thực cao nhất là ở môi trường TCM 199 + FSH + FCS (đạt 89,31%, $p < 0,05$). Kết quả này cao hơn so với nghiên cứu của Akçay và cs (2008). Theo nhóm tác giả này, tỷ lệ tế bào trứng bò thành thực trong môi trường TCM 199 có bổ sung FCS và FSH đạt 82,4% [15].

Ảnh hưởng của môi trường nuôi thành thực *in vitro* đến hiệu quả thụ tinh *in vitro* tế bào trứng bò

Trứng bò sau khi được thụ tinh với tinh trùng bò sữa HF đông lạnh, các hợp tử giả định sẽ được nuôi trong môi trường nuôi phôi CR1aa để theo dõi và đánh giá quá trình phát triển. Kết quả thu được cho thấy, tế bào trứng bò được nuôi thành thực *in vitro* trong môi trường TCM 199 và Ham's F10 có bổ sung FCS và FSH cho tỷ lệ tế bào trứng phân chia; tỷ lệ tạo phôi đầu, phôi nang, phôi thoát màng là cao hơn so với môi trường TCM 199 và Ham's F10 bổ sung FCS (bảng 3). Tỷ lệ phân chia (90,14%) và phát triển tới phôi đầu

(47,65%), phôi nang (23,44%) và thoát màng (3,9%) của tế bào trứng được nuôi thành thực *in vitro* trong TCM 199 có bổ sung FCS và FSH là cao hơn so với các môi trường còn lại ($p < 0,05$).

Bảng 3: ảnh hưởng của môi trường nuôi thành thực *in vitro* đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*

Môi trường	Số tế bào trứng thụ tinh			Số tế bào trứng phân chia		Phôi đầu		Phôi nang		Phôi thoát màng	
	n	N	%±SE	n	%±SE	n	%±SE	n	%±SE	n	%±SE
TCM 199 + FSH + FCS	142	128	90,14±1,36	61	47,65±1,71	30	23,44±1,52	5	3,9±1,79		
TCM 199 + FCS	115	87	76,65±2,43	29	33,33±1,54	11	12,64±1,83	0	0		
Ham F10 + FSH + FCS	121	96	79,34±3,24	31	32,29±1,62	12	12,5±1,35	0	0		
Ham F10 + FCS	104	63	60,58±1,71	11	17,46±1,83	2	3,17±2,95	0	0		

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$)

Kết quả ở bảng 3 cho thấy việc bổ sung kết hợp huyết thanh và hormone vào môi trường nuôi thành thực cải thiện được hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*. Tuy nhiên tỷ lệ tạo phôi đến giai đoạn cấy truyền (phôi nang) trong nghiên cứu này (23,44%) vẫn thấp hơn so với Saeki và cs (1991) (31%) [16]. Nguyên nhân có thể là do môi trường nuôi phôi của chúng tôi khác so với Saeki và cs (1991) [16]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng môi trường nuôi phôi là CR1aa, còn Saeki và cs (1991) sử dụng môi trường nuôi phôi là TCM 199 có bổ sung tế bào ống dẫn trứng [16]. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro* như: chất lượng tế bào trứng, môi trường nuôi thành thực, môi trường nuôi phôi. Để nâng cao được hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*, trong nghiên cứu này chúng tôi tiếp tục tiến hành đánh giá ảnh hưởng của môi trường nuôi phôi *in vitro* đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*.

Ảnh hưởng của môi trường nuôi phôi đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*

Qua các kết quả thu được, chúng tôi sử dụng trứng nuôi thành thực trong môi trường TCM 199 có bổ sung FCS và FSH để thụ tinh *in vitro* cho thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của hai môi trường nuôi phôi bò là SOFaa và CR1aa cùng được bổ sung 5% FCS đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*.

Bảng 4: ảnh hưởng của môi trường nuôi phôi đến hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*

Môi trường	Số tế bào trứng thụ tinh	Số tế bào trứng phân chia		Phôi đầu		Phôi nang		Phôi thoát màng	
		N	%±SE	n	%±SE	n	%±SE	n	%±SE
SOFaa + FCS	160	144	90±1,65	86	59,72±1,48	51	35,42±1,82	22	15,27±1,79
CR1aa + FCS	142	128	90,14±1,36	61	47,65±1,71	30	23,44±1,52	5	3,9±1,79

Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$)

Kết quả thu được ở bảng 4 cho thấy, không có sự khác nhau về tỷ lệ phân chia của các tế bào trứng ở hai lô thí nghiệm. Tuy nhiên, kết quả cho thấy nuôi phôi trong môi trường SOFaa cho tỷ lệ tạo phôi đầu, phôi nang và phôi nang thoát màng (hình 3) cao hơn so với môi trường CR1aa ($p < 0,05$). Kết quả này thể hiện ưu thế rõ rệt của môi trường SOFaa trong việc tạo phôi bò *in vitro* so với môi trường CR1aa.



Hình 3: phôi bò ở các giai đoạn phát triển phôi đầu, phôi nang và thoát màng

Theo Campos (2010), khi bổ sung 5% FCS vào môi trường nuôi phôi bò sẽ làm tăng tỷ lệ phôi nang [17]. Cũng đồng quan điểm như vậy, Taraves và cs (2008) đã nuôi phôi trong môi trường SOFaa + 5% FCS và nhận thấy tỷ lệ phôi phân chia, phôi nang, phôi nang thoát màng (tương ứng là 83,37; 53,68 và 30,87%) cao hơn so với môi trường SOFaa + 10% FCS (tương ứng là 80,46; 28,15 và 21,85%). Theo Taraves và cs, việc bổ sung 5% FCS vào môi trường nuôi phôi sẽ làm cho hàm lượng lipid thấp, giảm sự tích lũy các giọt mỡ nội bào, qua đó làm thay đổi hoạt động của ty thể, dẫn tới những thay đổi trong trao đổi năng lượng của phôi trong môi trường nuôi phôi [18]. Những sự thay đổi này sẽ giúp nâng cao tỷ lệ tạo phôi so với môi trường nuôi phôi có bổ sung 10% FCS.

Kết luận

Môi trường nuôi thành thực *in vitro* TCM 199 + FCS + FSH mang lại hiệu quả cao cho quá trình nuôi

thành thực *in vitro* tế bào trứng bò.

Môi trường nuôi phôi *in vitro* SOFaa bổ sung 5% FCS cho hiệu quả tạo phôi bò *in vitro* tốt hơn môi trường CR1aa bổ sung 5% FCS trong điều kiện tại Việt Nam.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài cấp nhà nước mã số ĐT-PTNTĐ.2011-G/11. Nhóm nghiên cứu cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật - Viện Chăn nuôi đã cho phép sử dụng các thiết bị phục vụ cho đề tài.

Tài liệu tham khảo

- [1] Erickson B.H (1966), "Development and senescence of the postnatal bovine ovary", *J Anim Sci*, **25**, pp.800-805.
- [2] Pieterse M.C, Kappen K.A, Kruip Th.A.M, Taverne M.A.M (1988), "Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries", *Theriogenology*, **30(4)**, pp.751-762.
- [3] Nguyễn Văn Lý, Lưu Công Khánh, Nguyễn Thị Thoa, Phan Lê Sơn, Chu Thị Yên, Nguyễn Thị Kim Anh, Vũ Ngọc Hiếu (2007), "Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật siêu âm hút tế bào trứng từ bò sông để tạo phôi trong ống nghiệm", *Tạp chí Khoa học công nghệ chăn nuôi*, **Số 1**, trang 54-58.
- [4] Phan Lê Sơn (2013), "Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả của kỹ thuật siêu âm hút tế bào trứng bò để tạo phôi trong ống nghiệm", *Luận án tiến sĩ khoa học nông nghiệp*.
- [5] Merton J.S, W De Roos A.P, Mullaart E, De Ruigh L, Kaal L, Vos P.L.A.M, Dieleman S.J (2003), *Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry*.
- [6] Zeron Y.A, Ocheretny O, Keda A, Borochoy D, Skla Arav A (2001), "Seasonal changes in bovine fertility: Relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles", *Reproduction*, **121**, pp. 447-454.
- [7] Saitoh N, Kanagawa H, Shimohira I (1995), "Manual of bovine embryo transfer", *Japan Livestock Technology association*.
- [8] Bracket B.G, Oliphant G (1975), "Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*", *Biol Reprod*, **12**, pp.260-274.
- [9] Mapletoft R.J, Bos G.A (2013), "Evaluation and classification of bovine embryos Anim", *Reprod*, **10(3)**, pp.344-348.
- [10] Nguyễn Văn Lý (2006), "Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm ở bò tại Việt Nam", *Luận án tiến sĩ nông nghiệp*, Viện Chăn nuôi, trang 140-143.

[11] Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị Ước, Lê Văn Ty, Quán Xuân Hữu, Nguyễn Trung Thành, Bùi Linh Chi, Nguyễn Văn Hạnh, Nguyễn Thùy Anh, Nguyễn Việt Linh, Bùi Xuân Nguyên (2003), “Kết quả thụ tinh ống nghiệm và cấy phôi ở bò lai Sind”, *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, trang 699-702.

[12] Yang X, Kupota C, Suzuki H, Taneja M, Bols P.E.J, Presicce G.A (1998), “Control of oocyte maturation in cows - biological factors”, *Theriogenology*, **49**, pp.471-482.

[13] Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T (1997), “Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence”, *Theriogenology*, **48**, pp.769-774.

[14] Neglia G, Marin M, Di Palo R, Wilding M, Caracciolo di Brienza V, Dale B, Gasparrini B, Zicarelli L (2001), “A comparison of *in vitro* maturation in buffalo (*Bubalus hbulis*) and bovine oocytes using confocal microscopy”,

Theriogenology, **55**, pp.488.

[15] Akçay E, Uysal O, Yavas I and Ar U (2008), “The effects of serum, steroid and gonadotropins on *in vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes”, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **7(2)**, pp.178-183.

[16] Saeki K, Hoshi M, Leibfried-Ruthledge M.L, First N.L (1991), “*In vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured in Serum-free medium”, *Biol Reprod*, **44**, pp.256-60.

[17] Campos J.M.A (2010), “Effects of serum addition to culture medium on gene expression in day - 7 and day - 14 bovine embryos”, *Thesis Master of Science*.

[18] Tavares L.M.T, Feitosa W.B, Mello M.R.B, Nicácio A.C, Lima A.S, Assumpção M.E.O.A, Visintin J.A (2008), “Is the early reduction of fetal calfserum concentration in bovine *in vitro* embryo culture beneficial, Anim”, *Reprod*, **5(1/2)**, pp.34-38.