

انتقال موفقیت آمیز جنین بز بعد از نگهداری به روش ویتریفیکاسیون

چکیده
انتقال جنین بز که به روش ویتریفیکاسیون در مرحله مورلا و بلاستوسیست در ازت مایع نگهداری شده بود به ۹ رأس بز ماده سبب گردید تا دو رأس بزغاله از آنها متولد گردد.

● محقق: دکتر اتی یوسویاتی

مؤسسه تحقیقات دامپروری کشور

● مترجم: دکتر فریدون امینی

عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات دامپروری کشور

مقدمه

اولین انتقال جنین موفقیت آمیز در بز در سال ۱۹۷۶ توسط Moore و Bilton انجام گردید، از آن زمان تاکنون بررسیهای کمی روی تعدادی از بزها انجام شده است و روش انجماد شبیه انجماد جنین گاو است. به تازگی روش جدیدی جهت انجماد جنین موش ابداع شده است که به آن Vitrification میگویند در این روش، جنین در معرض غلظتهای بالای مواد محافظت کننده سلولی (Cryoprotectants) قرار میگیرد و متعاقب آن جنین را در ازت مایع فرو می‌برند.

مواد و روشها

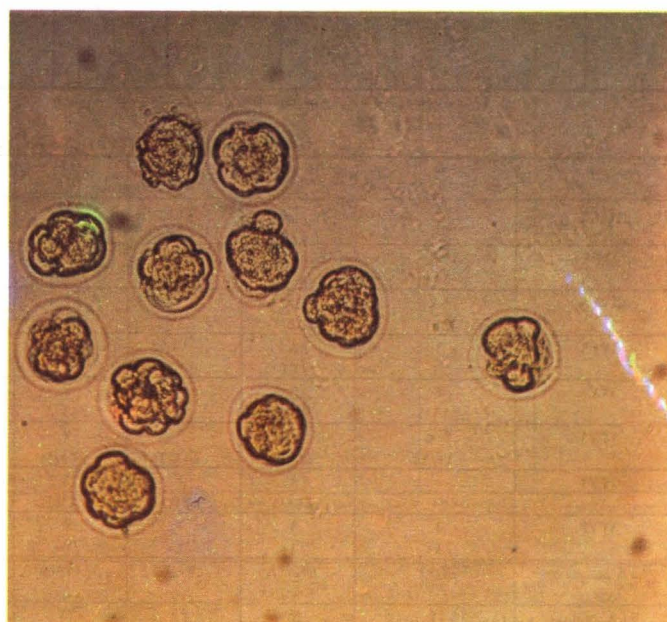
پانزده بز دو رک (بز نر شیری آلمانی × بز ماده Boer) چند شکم‌زا توسط هورمون Synchromate B^P که به صورت میله در زیر گوش کاشته می‌شود به مدت ۱۰ روز همزمان گردیدند. (۱/۵ میلی‌گرم (Boxmeer, Intervet: Norgstomet^P هلند).

سوپراواولاسیون با هورمون FSH خوک که با ۴۰ و یا با ۸۰ درصد LH خوکی مخلوط گردیده بود انجام گرفت. سازنده هورمون فوق پرفسور بیکر از کشور بلژیک می‌باشد. تزریقات به صورت داخل عضلانی و به فاصله ۱۲ ساعت انجام گردید. دزهای FSH به ترتیب برابر ۰.۴، ۰.۳، ۰.۲، ۰.۲، ۰.۲، ۰.۲ میلی‌گرم بود. تزریق FSH ۲ روز قبل از خارج کردن میله هورمونی شروع گردید. با استفاده از بز نر پیش‌بنددار بزهای ماده فحل مورد شناسائی قرار می‌گرفتند. بزهای فحل روزانه دوباره با بزهای نر تأیید شده آمیزش داده می‌شدند.

بزهای دهنده جنین (Donor) ۶ تا ۷ روز بعد از آخرین جفتگیری ذبح گردیدند و دستگاه تناسلی آنها خارج گردید. هر شاخ رحم با ۴۰ میلی لیتر سالین بوفرفسفات Dulbecco شستشو گردید (FRG) (Heidelberg, Serva, PBS) در محلول فوق ۱ گرم در لیتر گلوکز، ۲۶٪ گرم در لیتر پیروات سدیم، ۱۰/۰۰۰ واحد بین‌المللی در لیتر پنی‌سیلین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین اضافه گردید (PBS تغییر یافته). محلول فوق با سرم ۲ درصد بزی که در حرارت ۵۶ درجه سانتیگراد غیرفعال شده بود مخلوط گردید. جنینها از

محیط شستشو دهنده رحم جدا شده و دوباره با محیط کشت در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند. زمان بین کشتار بزهای دهنده جنین و جدا کردن جنینها از شاخ رحم بین ۲۰ تا ۳۰ دقیقه به طول انجامید و فقط مورولا و بلاستوسیستهایی که بی‌عیب و سالم بودند (بدون غلایم تجزیه سلولی و یا ناصافی سطح آنها و یا نقص لایه Zona plucida) در محیط کشت گذاشته شدند (عکس ۱ و ۲). ۲ تا ۴ ساعت بعد از برداشت جنینها، آنها را در محلولی از PBS تغییر یافته با ۱۰ درصد Propanediol و ۱/۴ مول گلیسرول و ۲۰ درصد PBS تغییر یافته با ۱۰ درصد ۲/۵ مول قرار داده شدند. بعد از یک زمان تعادل ۱۰ دقیقه‌ای هر جنین در ۰/۰۴ میلی لیتر محلولی که شامل PBS تغییر یافته با ۲۵ درصد ۳/۴ مول گلیسرول و ۲۵ درصد Propanediol ۳/۴ مول بود در یک پایوت ۰/۲۵ میلی لیتری (Landshut FRG) قرار داده شدند. پایوت محتوی ۰/۲ میلی لیتر ۱ مول محلول سوکوروز بود که توسط حباب هوا از این محلول جنینی جدا شده بود (شکل ۱). دهانه پایوت به سرعت بسته شده و در محلول ازت مایع قرار داده می‌شود. بعد از مدت یک تا هشت ماه پایوت‌ها

۲





embryos from a bluetongue infected goatherd without bluetongue transmission. *Theriogenology* 26:279-290

3. Hephurn, J., 1987, Successful embryo transfer in Angora goats. Report of the 3rd Scientific Meeting EETA. pp.155-157 abstr.

4. Pelaez Valdes, J.H.; 1987, Verfahren zur gewinnung konervierung von mause und ziegenembryouen. *dissertation, Landwirtschaftliche Fakultät Gottingen.*

5. Tsunoda, Y., Tokunaga, T., Okubo, Y. and Sugie, T.; 1987, Beneficial effect of agar for the frozen storage of bisected embryos. *Theriogenology* 28:317-322

6. Baril, G., Casamitjana, P., Perrin, J. and Vallet, J.C.; 1988, Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. Report of the 4th Scientific Meeting EETA. pp.67-95

7. Rao, V.H., Sarmah, B.C., Agrawal, K.P., Ansari, M.R. and Bhattacharyya, N.K.; 1988, Survival of goat embryos frozen and thawed rapidly. *Anim. Reprod. Sci.* 16:264

8. Rall, V.F. and Fahy, G.M.; 1985, Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196° by vitrification. *Nature* 313: 573-575

اوولاسیون با ضریب $10/2$ (انحراف معیار $7/2$) انجام اوولاسیون انجام گرفت در مجموع 96 تخم و جنین بدست آمد.

از 26 مورولای بدست آمده 24 عدد آن (92%) از لحاظ ظاهری بی‌عیب بودند. بعد از انجماد و خارج شدن از انجماد 23 عدد مورولای بدست آمده 13 عدد آن (57%) قابل انتقال تشخیص داده شد. از 25 بلاستوسیست بدست آمده 22 عدد آن (88%) بی‌عیب بودند که بعد از انجماد و خارج کردن از انجماد 21 عدد بدست آمده که از این تعداد 16 عدد آن (76%) قابل انتقال تشخیص داده شد.

از 9 رأس بز حامل، دو رأس آبستن گردیدند. یک بز ماده که دو مورولا به آن انتقال شده بود بعد از 150 روز یک بزغاله ماده زایش نمود.

این آزمایش برای اولین بار در بز انجام شده است و اولین گزارش موفقیت‌آمیز انتقال جنین بز به روش ویتریفیکاسیون می‌باشد.

منابع مورد استفاده

1. Bilton, R.J. and Moore, N.W.; 1976, In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. *Austr. J. Biol. Sci.* 29:125-129
2. Chemineau, P., Procureur, R., Cognie, Y., Lefevre, P.C., Locatelli, A. and Chupin, D.; 1986, Production, freezing and transfer of

در آب 20° درجه سانتیگراد قرار داده شده تا مایع شوند و محتویات آنها در ظرفهای حاوی محیط‌های کشت بافتی خارج می‌شوند (Greiner Nurtigen, FRG). ظرفها حاوی یک میلی لیتر یک مول محلول ساکاروز بودند. بعد از ده دقیقه جنینها در محلول PBS تغییر یافته با سرم بزی 20° درصد به مدت 10 دقیقه دوبار شستشو گردیدند. در انتها جنینها با میکروسکوپ (عدسی 50°) ارزشیابی شدند. ده مورولا و 13 بلاستوسیست سالم تشخیص داده شد یا به عبارت دیگر علایم تجزیه سلولی یا دژنره شده در آنها مشاهده نگردید. با عمل جراحی به 9 رأس بز شکم اول گیرنده که 5 تا 6 روز از آخرین فعلی طبیعی آنها می‌گذشت انتقال داده شدند. جنینها در انتهای بالایی شاخ رحمی که تخمدان مربوط به آن شاخ دارای جسم زرد است کاشته می‌شد. در دو گیرنده هر کدام دو مورولا، در دو گیرنده دیگر هر کدام سه مورولا، در دو گیرنده دیگر 2 بلاستوسیست و در سه گیرنده دیگر به هر کدام سه بلاستوسیست انتقال داده شد.

در حال حاضر این آزمایش مجدداً توسط نویسنده مقاله خانم دکتر اتی یوسویاتی در مؤسسه تحقیقات دامپروری بر روی گوسفند در حال اجرا است.

نتایج این مقاله در نشریه *Theriogenology* شماره 4 جلد 134 اکتبر 1990 به چاپ رسیده است. این آزمایش در ماه دسامبر سال 1989 در دانشکده کشاورزی دانشگاه گوتینگن توسط نویسنده مقاله انجام شده است.

بحث و نتیجه گیری

در 13 رأس از 15 رأس بز دهنده جنین، اوولاسیون با ضریب $10/2$ (انحراف معیار $7/2$) انجام گرفت. یا به عبارتی از 15 رأس بز در $10/2$ رأس



عکس ۱
مورولاهای بدست آمده از بز

عکس ۲
در عکس تعدادی بلاستوسیست با فلش مشخص شده است

عکس ۳
بزهای نگهداری شده جهت انجام تحقیق