การอนุรักษ์และเพิ่มจำนวนกระบือปลักพันธุ์ดีด้วยการผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้วและการย้ายฝากนิวเคลียสด้วยเซลล์ร่างกาย

บทคัดย่อ

246747

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็น 6 การทดลอง ในการทดลองที่ 1 มีวัตถุประสงค์เพื่อหาวิธีการกระตุ้นที่เหมาะสมสำหรับไข่กระบือปลักที่ผ่านการทำ intracytoplasmic sperm injection (ICSI) ทำการตรวจสอบการเกิด second polar body (2^{nd} PB) หลังจากกระตุ้นด้วย 5 μM ionomycin (Io) หรือ 7% ethanol (EtOH) ที่ 3 6 และ 9 ชั่วโมงหลังทำ ICSI พบการเกิด 2^{nd} PB สูงสุด ที่ 3 ชั่วโมงหลังทำ ICSI และการเกิด 2^{nd} PB ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย EtOH (68%) สูงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย Io (46%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คัดเลือกไข่ที่มี 2^{nd} PB ไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.9 mM 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) นาน 3 ชั่วโมง หรือ 10 μg/mL cychloheximide (CHX) นาน 5 ชั่วโมง อัตราไข่มี male และ female pronuclei ในกลุ่ม EtOH ร่วมกับ CHX (EtOH+CHX) (62%) สูงกว่ากลุ่ม Io+CHX (42%) และ EtOH+6-DMAP (48%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่ม Io+6-DMAP ให้ผลปานกลาง (58%) อัตราตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสสูงสุดได้จากกลุ่ม Io+6-DMAP (29%) และ EtOH+CHX (24%) ซึ่งสูงกว่ากลุ่ม Io+CHX (6%) and EtOH+6-DMAP (17%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นด้วย Io ร่วมกับ 6-DMAP และ EtOH ร่วมกับ CHX ทำให้ไข่กระบือปลักที่ผ่านการทำ ICSI มีการแบ่งตัวและเจริญถึงระยะบลาสโตซีสได้สูงที่สุด

การทดลองที่ 2 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของเซลล์ต้นแบบ 4 ชนิดเพื่อทำโคลนนิ่งโคและกระบือปลัก ได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อน เซลล์แกรนูโลซา และเซลล์คิวมูลัส เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของตัวอ่อนโคลนโคและกระบือปลัก ผลิตตัวอ่อนโคลนโคและกระบือปลักโดยเชื่อมเซลล์ต้นแบบกับไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว นำตัวอ่อนโคลนและไข่สุกที่ไม่ได้ดูดนิวเคลียสออกไปกระตุ้นแบบ parthenogenetic activatiom (PA) และเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 7 วันเพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโตถึงระยะบลาสโตซีส ใช้วิธี differential staining ตรวจสอบจำนวนเซลล์ trophectoderm (TE) และ inner cell mass (ICM) และสัดส่วนของ ICM ในตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเพื่อประเมินคุณภาพของตัวอ่อน อัตราการเชื่อมของเซลล์คิวมูลัสกับไข่ที่ดูดนิวเคลียสออกแล้วต่ำกว่าเซลล์ต้นแบบชนิดอื่นทั้งในโคและกระบืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการแบ่งตัวและตัวอ่อนเจริญถึงระยะ 8 เซลล์ มอรูลา และบลาสโตซีสของตัวอ่อนโคลนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติภายในสปีชีส์เดียวกัน อย่างไรก็ตามการแบ่งตัวของตัวอ่อนโคลนโคที่ได้จากเซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อนมีอัตราสูงกว่าตัวอ่อนโค PA และตัวอ่อนกระบือโคลนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตัวอ่อนโคลนโคเจริญถึงระยะบลาสโตซีสยกเว้นที่ได้จากเซลล์คิวมูลัสมีอัตราสูงกว่าตัวอ่อนโคลนกระบืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการทำโคลนนิ่งกระบือ ตัวอ่อนที่ได้จากเซลล์คิวมูลัสเพียงชนิดเดียวที่มีอัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่าตัวอ่อน PA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางตรงกันข้ามตัวอ่อน

โคลนโคจากเซลล์ต้นแบบทุกชนิดเจริญถึงระยะบลาสโตซีสสูงกว่าตัวอ่อนโค PA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สัดส่วนของ ICM ระหว่างตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ได้จากเซลล์ต้นแบบทุกชนิดไม่มีความแตกต่างกันของทั้งสองสปีชีส์ เซลล์ไฟโบรบลาสจากใบหู เซลล์ไฟโบรบลาสจากลูกอ่อน เซลล์แกรนูโลซา และเซลล์คิวมูลัส ที่ใช้ในการโคลนนิ่งโคและกระบือมีศักยภาพในการสนับสนุนการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสได้เท่าเทียมกันโดยมีคุณภาพตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไม่แตกต่างกัน

การทดลองที่ 3 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบอัตราการเจริญของไข่สุกกระบือปลักถึงระยะบลาสโตซีส หลังจากแช่แข็งโดยวิธี vitrification และทำละลายแล้วทำ pharthenogenetic activation (PA) หรือ intracytoplasmic sperm injection (ICSI) การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย ในการทดลองที่ 1 ทำการตรวจสอบผลของระยะเวลาที่ไข่อยู่ใน cryoprotectant (CPA) ต่อการเจริญหลังจากทำ PA นำไข่ที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้วไว้ในน้ำยาที่มี 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose นาน 30, 45 หรือ 60 วินาที (กลุ่ม 1min+30s 1min+45s และ 1min+60s ตามลำดับ) หลังจากนั้นนำไข่ไปไว้ในน้ำยาทำละลาย (TCM199 HEPES + 20% FBS and 0.5M sucrose) นาน 5 นาที แล้วล้างในน้ำยา TCM199 HEPES + 20% FBS นาน 5 นาที ใช้ไข่สุกที่ไม่ถูก CPA เป็นกลุ่มควบคุม อัตรามีชีวิตรอดของไข่หลังจากย้อมดูด้วย fluorescein diacetate (FDA) เป็น 100% ในทุกกลุ่ม อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซีสหลังจากทำ PA ระหว่างกลุ่ม 1min+30s (16%) และกลุ่มควบคุม (26%) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่สูงกว่ากลุ่ม 1min+45s (10%) และ 1min+60s (2%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการทดลองที่ 2 ทำการทดสอบผลของระยะเวลาที่ไข่อยู่ใน CPA สองกลุ่มคือ 1min+30s และ 1min+45s แล้วนำไข่ไปแช่แข็งโดยวิธี Microdrop vitrification เพื่อดูอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากทำ PA อัตรามีชีวิตรอดของไข่แช่แข็งในกลุ่ม 1min+30s 1min+45s และกลุ่มควบคุม (ไม่ถูก CPA) ได้ผลไม่แตกต่างกัน (97% 95% และ 100% ตามลำดับ) การเจริญถึงระยะบลาสโตซีสของไข่ที่มีชีวิตรอดในกลุ่มแช่แข็ง 1min+30s (8%) สูงกว่ากลุ่ม 1min+45s (4%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (26%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในการทดลองที่ 3 ทำการทดสอบผลของระยะเวลาที่ไข่อยู่ใน CPA สองกลุ่มคือ 1min+30s และ 1min+45s แล้วนำไข่ไปแช่แข็งโดยวิธี Microdrop vitrification เพื่อดูอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากทำ ICSI อัตรามีชีวิตรอดของไข่แช่แข็งในกลุ่ม 1min+30s 1min+45s และกลุ่มควบคุมไม่แตกต่างกัน (96% 91% และ 100% ตามลำดับ) หลังจากทำ ICSI จะทำการกระตุ้นไข่ และคัดเลือกไข่ที่มี 2nd PB ไปเลี้ยงในหลอดแก้วนาน 7 วัน การเจริญถึงระยะบลาสโตซีสของไข่แช่แข็งกลุ่ม 1min+30s (11%) สูงกว่ากลุ่ม 1min+45s (7%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (23%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดลองนี้สรุปได้ว่าไข่แช่แข็งโดยวิธี Microdrop vitrification กลุ่ม 1min+30s ให้อัตราตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสสูงสุดหลังการทำ PA และ ICSI

การทดลองที่ 4 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของน้ำยา vitrification สองชนิดและวิธีทำ vitrification สองชนิดต่ออัตราการมีชีวิตรอดของไข่สุกกระบือปลัก นอกจากนี้ยังตรวจสอบอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากทำ intracytoplasmic sperm injection (ICSI) นำไข่กระบือปลักที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้วมาแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มเพื่อแช่แข็งโดยใช้ 1) วิธี Cryotop ร่วมกับน้ำยา VA (10% DMSO+10% EG นาน 1 นาที

และนำไปไว้ใน 20% DMSO+20%EG+0.5M sucrose นาน 30 วินาที; Cryotop+VA), 2) วิธี Cryotop ร่วมกับน้ำยา VB (4% EG นาน 12-15 นาที และนำไปไว้ใน 35% EG+5% PVP และ 0.4 M trehalose นาน 30 วินาที; Cryotop+VB), 3) วิธี Microdrop ร่วมกับน้ำยา VA (Microdrop+VA), 4) วิธี Microdrop ร่วมกับน้ำยา VB (Microdrop+VB), 5) กลุ่มควบคุมที่ย้อมด้วย fluorescein diacetate (FDA) (control), 6) กลุ่มควบคุมที่ไม่ย้อม FDA (fresh control) ทำการตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดของไข่ด้วย FDA แล้วคัดเลือกไข่ที่มีชีวิตรอดไปทำ ICSI อัตราไข่มีชีวิตรอดในน้ำยา VA (Microdrop+VA: 93% และ Cryotop+VA: 97%) สูงกว่าน้ำยา VB (Microdrop+VB: 79%, และ Cryotop+VB: 81%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ต่ำกว่ากลุ่ม control (100%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการเกิด second polar body (2^{nd} PB) และตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีสในกลุ่ม control และ fresh control สูงกว่ากลุ่มที่แช่แข็ง แต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่แช่แข็งทั้งอัตราการเกิด 2^{nd} PB และตัวอ่อนเจริญถึงระยะบลาสโตซีส การทดลองนี้สรุปได้ว่าน้ำยา VA ให้อัตราไข่มีชีวิตรอดสูงกว่าน้ำยา VB การแช่แข็งโดยวิธี Cryotop และ Microdrop vitrification ให้ผลสำเร็จเท่าเทียมกัน

การทดลองที่ 5 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของน้ำยา vitrification สองชนิดและวิธีทำ vitrification สองชนิดต่ออัตราการมีชีวิตรอดของไข่สุกกระบือปลัก และอัตราการเจริญของตัวอ่อนหลังจากทำ *in vitro* fertilization (IVF) นำไข่กระบือปลักที่เลี้ยงให้สุกในหลอดแก้วมาแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มเพื่อแช่แข็งโดยใช้ 1) วิธี Cryotop ร่วมกับน้ำยา VA (10% DMSO+10% EG นาน 1 นาที และนำไปไว้ใน 20% DMSO+20%EG+0.5M sucrose นาน 30 วินาที; Cryotop+VA), 2) วิธี Cryotop ร่วมกับน้ำยา VB (4% EG นาน 12-15 นาที และนำไปไว้ใน 35% EG+5% PVP และ 0.4 M trehalose นาน 30 วินาที; Cryotop+VB), 3) วิธี SSV ร่วมกับน้ำยา VA (SSV+VA), 4) วิธี SSV ร่วมกับน้ำยา VB (SSV+VB), 5) กลุ่มควบคุมที่ไม่ย้อม FDA (fresh control) ทำการตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดของไข่ด้วย FDA แล้วคัดเลือกไข่ที่มีชีวิตรอดไปทำ IVF อัตราการมีชีวิตรอดของไข่ที่แช่แข็งในกลุ่ม Cryotop+VA (92%) สูงกว่ากลุ่ม SSV+VA (86%), Cryotop+VB (76%) และ SSV+VB (71%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามยังคงต่ำกว่ากลุ่ม fresh control (100%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อัตราการเจริญของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีสของไข่แช่แข็งในกลุ่ม Cryotop+VA (9%) สูงกว่ากลุ่ม Cryotop+VB (3%), SSV+VA (5%) และ SSV+VB (1%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังคงต่ำกว่ากลุ่ม fresh control (19%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการแช่แข็งโดยวิธี Cryotop vitrification ร่วมกับการใช้น้ำยา VA ให้อัตราไข่มีชีวิตรอดและได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสสูงสุด

การทดลองที่ 6 การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโกรทแฟ็กเตอร์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลขนาดเล็กภายนอกร่างกายในกระบือปลัก แบ่งฟอลลิเคิลออกเป็น 3 กลุ่ม ตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง กลุ่มที่ 1 ขนาด 200-399 ไมโครเมตร กลุ่มที่ 2 ขนาด 400-599 ไมโครเมตร และ กลุ่มที่ 3 ขนาด 600-799 ไมโครเมตร การทดลองแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม คือ ทรีทเม้นท์ 1 ไม่มีการเติมโกรทแฟ็กเตอร์ (กลุ่มควบคุม) ทรีทเม้นท์ 2 เติม 50 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF) ทรีทเม้นท์ 3 เติม 100 ng/mL insulin-like growth factor-I (IGF-I) ทรีทเม้นท์ 4 เติม 50 ng/mL epidermal growth factor (EGF) ทรีทเม้นท์ 5 เติม 50 ng/mL bFGF+100 ng/mL IGF-I ทรีทเม้นท์ 6 เติม 50 ng/mL bFGF+50 ng/mL EGF ทรีทเม้นท์ 7 เติม 100 ng/mL

246747

IGF-I+50 ng/mL EGF และ ทรีทเม้นท์ 8 เติม 50 ng/mL bFGF+100 ng/mL IGF-I+50 ng/mL EGF การตรวจสอบการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลทำโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในวันที่ 7 และ วันที่ 14 ของการเลี้ยง

ผลการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในวันที่ 7 และ 14 พบว่าฟอลเคิลในกลุ่มที่ 1 ซึ่งเลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF, IGF-I, bFGF+IGF-I, bFGF+EGF, IGF-I+EGF และ bFGF+IGF-I+EGF สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในวันที่ 7 ได้ แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนผลการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางในวันที่ 14 พบว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF และ bFGF+IGF-I สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ผลการวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 2 วันที่ 7 และ14 พบว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF และ bFGF+IGF-I สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้มากกว่าฟอลลิเคิลที่เลี้ยงในทรีทเม้นท์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ผลการวัดอัตราการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 3 วันที่ 7 พบว่าน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF IGF-I และ bFGF+IGF-I สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตาม ผลการวัดอัตราการเจริญของฟอลลิเคิลในวันที่ 14 พบว่ามีเพียงน้ำยาที่มีโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF เท่านั้นที่สามารถเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของฟอลลิเคิลได้ ($P<0.05$) การศึกษาอัตราการอยู่รอดของไข่พบว่า โกรทแฟ็กเตอร์ bFGF มีอัตราการรอดชีวิตของไข่มากกว่าทรีทเม้นท์อื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงมีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของไข่ โดยฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 1 ต้องการระยะเวลาในการเลี้ยงมากกว่า 14 วัน ซึ่งเห็นได้จาก meiotic stage หยุดอยู่ที่ระยะ GV ฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 2 เหมาะสมกับการเลี้ยงในระยะเวลา 14 วัน โดยเห็นได้จาก meiotic stage ของไข่สามารถเจริญได้จนถึงระยะ MI ในขณะที่ฟอลลิเคิลในกลุ่มที่ 3 ต้องการระยะเวลาในการเลี้ยงน้อยกว่า 14 วัน โดยเห็นได้จากอัตราการมีชีวิตรอดของไข่มีน้อยมาก ซึ่งพบว่าไข่จำนวนมากตายเนื่องจากระยะเวลาในการเลี้ยงนานเกินไป จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโกรทแฟ็กเตอร์ bFGF, IGF-I และ bFGF+IGF-I ช่วยให้ฟอลลิเคิลมีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นแต่ในทางกลับกันโกรทแฟ็กเตอร์ EGF นั้นไม่ช่วยให้ฟอลลิเคิลมีขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้น และยังอาจส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลในกระบือปลักอีกด้วย

Abstract

246747

This project was divided into 6 experiments. In Experiment 1, the objective of this study was to optimize the activation protocol for buffalo oocytes after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). The release of the second polar body (2^{nd} PB) at 3, 6 and 9 h after ICSI of *in vitro* matured oocytes activated either with 5 μM ionomycin (Io) or 7% ethanol (EtOH) was preliminary examined. The highest rate of 2^{nd} PB extrusion occurred at 3 h of activation and the 2^{nd} PB extrusion in EtOH group (68%) was significantly higher than in Io group (46%). Oocytes that extruded the 2^{nd} PB were selected and cultured either with 1.9 mM 6-

dimethylaminopurine (6-DMAP) for 3 h or with 10 μg/mL cychloheximide (CHX) for 5 h. Significantly higher rate of oocytes formed male and female pronuclei in EtOH combined with CHX (EtOH+CHX) (62%) group compared to those of Io+CHX (42%) and EtOH+6-DMAP (48%) groups whereas Io+6-DMAP group showed intermediate value (58%). Significantly higher blastocyst formation rates were obtained in Io+6-DMAP (29%) and EtOH+CHX (24%) groups than in Io+CHX (6%) and EtOH+6-DMAP (17%) groups. Our results indicate that buffalo ICSI oocytes are effectively activated by combination treatment of Io with 6-DMAP and EtOH with CHX resulting in the highest cleavage and blastocyst formation rates.

Experiment 2, the objective of this experiment was to investigate the effect of donor cell types on the developmental potential and quality of cloned swamp buffalo embryos in comparison with cloned cattle embryos. Fetal fibroblasts (FFs), ear fibroblasts (EFs), granulosa cells (GCs) and cumulus cells (CCs) were used as the donor cells in both buffalo and cattle. The cloned cattle or buffalo embryos were produced by fusion of the individual donor cells with enucleated cattle or buffalo oocytes, respectively. The reconstructed (cloned) embryos and *in vitro* matured oocytes without enucleation were parthenogenetically activated (PA) and cultured for 7 days. Their developmental ability to the blastocyst stage was evaluated. The total number of trophectoderm (TE) and inner cell mass (ICM) cells and the ICM ratio in each blastocyst was determined by differential staining as an indicator of embryo quality. The fusion rate of CCs with enucleated oocytes was significantly lower than for those of other donor cell types both in cattle and buffalo. The rates of cleavage and development to the 8 cell, morula and blastocyst stages of cloned embryos derived from all donor cell types did not significantly differ within the same species. However, the cleavage rate of cloned cattle embryos derived from FFs was significantly higher than those of cattle PA and cloned buffalo embryos. The blastocyst rates of cloned cattle embryos, except for the ones derived from CCs, were significantly higher than those of cloned buffalo embryos. In buffalo, only cloned embryos derived from CCs showed a significantly higher blastocyst rate than that of PA embryos. In contrast, all the cloned cattle embryos showed significantly higher blastocyst rates than that of PA embryos. There was no difference in ICM ratio among any of the blastocysts derived from any of the donor cell types and PA embryos in both species. FFs, EFs, GCs and CCs had similar potentials to support development of cloned cattle and buffalo embryos to the blastocyst stage with the same quality.

Experiment 3, the objective of this experiment was to investigate the potential of swamp buffalo oocytes vitrified-warmed at the metaphase of the second meiotic cell division (M-II) stage to develop to the blastocyst stage after parthenogenetic activation (PA) or intracytoplasmic sperm injection (ICSI). In Experiment 1, we examined the effects of exposure time of oocytes to cryoprotectants (CPA) on their *in vitro* development after PA. *In vitro* matured (IVM) oocytes were placed in 10% dimethylsulfoxide (DMSO) +

10% ethylene glycol (EG) for 1 min and then exposed to 20% DMSO + 20% EG + 0.5 M sucrose for 30 s, 45 s or 60 s (1min+30s, 1min+45s and 1min+60s groups, respectively). The oocytes were then exposed to warming solution (TCM199 HEPES + 20% FBS and 0.5M sucrose) for 5 min and then washed in TCM199 HEPES + 20% FBS for 5 min. IVM oocytes without CPA treatments served as a control group. The viability assessed by fluorescein diacetate (FDA) staining was 100% in all groups. The developmental rates after PA to the blastocyst stage between 1min+30s (16%) and control (26%) groups did not differ significantly, but they were significantly higher than those in 1min+45s (10%) and 1min+60s (2%) groups. In Experiment 2, we examined the effect of two CPA exposure times, 1min+30s and 1min+45s on the *in vitro* development after PA of oocytes vitrified by the Microdrop method. The viabilities in vitrified 1min+30s, 1min+45s and the control (without CPA treatments) groups were not different (97%, 95% and 100%, respectively). The development of surviving oocytes to the blastocyst stage in the vitrified 1min+30s group (8%) was significantly higher than that in the vitrified 1min+45s group (4%) and significantly lower than those in control group (26%). In Experiment 3, we examined the effect of two CPA exposure times, 1min+30s and 1min+45s on *in vitro* development after ICSI of vitrified oocytes. Viabilities in vitrified oocytes among 1min+30s, 1min+45s and control groups were not different (96%, 91% and 100%, respectively). After ICSI, vitrified-warmed oocytes were activated and oocytes with the second polar body were cultured for 7 days. The development of ICSI oocytes to the blastocyst stage in the vitrified 1min+30s group (11%) was significantly higher than that in the vitrified 1min+45s (7%) group and significantly lower than those in control group (23%). In conclusion, our study demonstrated that the 1min+30s CPA treatment regimen could yield the highest blastocyst formation rates after PA and ICSI for oocytes vitrified by the Microdrop method.

Experiment 4, the objective of this experiment was to examine the effects of two types of vitrification solution, and of two types of vitrification technique on the survival rate of vitrified-warmed buffalo MII oocytes were examined. Furthermore, the developmental capacity of vitrified-warmed buffalo MII oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) was investigated. *In vitro* matured (IVM) oocytes were randomly separated into 6 groups and cryopreserved by using 1) Cryotop method combined with VA solution (10% DMSO+10% EG for 1 min and then 20% DMSO+20%EG+0.5M sucrose for 30 sec; Cryotop+VA), 2) Cryotop method combined with VB solution (4% EG for 12-15 min and then 35% EG+5% PVP and 0.4 M trehalose for 30 sec; Cryotop+VB), 3) Microdrop method combined with VA solution (Microdrop+VA), 4) Microdrop method combined with VB solution (Microdrop+VB), 5) Control oocytes stained with fluorescein diacetate (FDA) (control), 6) Fresh control oocytes without staining by FDA (fresh control). The survival rate of oocytes was examined by FDA staining and surviving oocytes were subjected to ICSI. The oocytes viability of VA solution (Microdrop+VA: 93% and Cryotop+VA: 97%) were significantly

higher than that in VB solution (Microdrop+VB: 79% and Cryotop+VB: 81%), but significantly lower than that in control groups (100%). The 2nd PB extrusion rate and the capacity of embryo development to the blastocyst stage in control and fresh control groups were significantly higher than that in vitrified groups, but no difference among vitrified groups. There was no difference between control and fresh control groups in 2nd PB extrusion and embryo development. In conclusion, VA solution could yield higher survival rate of vitrified oocytes than VB solution, Cryotop and Microdrop are equally suitable techniques for buffalo oocytes vitrification.

Experiment 5, the objective of this experiment was to investigate the effects of two types of vitrification solution and two types of vitrification method on the survival and developmental rates of matured swamp buffalo oocytes after *in vitro* fertilization (IVF). *In vitro*-matured oocytes were randomly divided into 5 groups and cryopreserved by using 1) Cryotop method combined with VA solution (10% DMSO+10% EG for 1 min and then 20% DMSO+20%EG+0.5M sucrose for 30 sec; Cryotop+VA), 2) Cryotop method combined with VB solution (4% EG for 12-15 min and then 35% EG+5% PVP and 0.4 M trehalose for 30 sec; Cryotop+VB), 3) SSV method combined with VA solution (SSV+VA), 4) SSV method combined with VB solution (SSV+VB), 5) Fresh oocytes without staining by FDA (fresh control). The survival rate of oocytes was examined by FDA staining and surviving oocytes were subjected to IVF. The survival rate of vitrified-warmed oocytes in Cryotop+VA (92%) group was significantly higher than that of SSV+VA (86%), Cryotop+VB (76%) and SSV+VB (71%) groups. However, they were still significantly lower than that of fresh control group (100%). The blastocyst rate of vitrified oocytes in Cryotop+VA group (9%) was significantly higher than that of Cryotop+VB (3%), SSV+VA (5%) and SSV+VB (1%) groups, but still significantly lower than that of fresh control group (19%). From these results can be concluded that Cryotop vitrification method combined with VA solution yielded the highest survival and blastocyst rates.

Experiment 6, the objective of this experiment was to examine the effects of growth factors (IGF-I, EGF and bFGF) on *in vitro* growth of swamp buffalo early antral follicles. Buffalo early antral follicles were isolated from ovaries by enzymatic and mechanical approaches. The early antral follicles were divided into 3 groups, depended on their diameters, group I: 200-399 μm, group II: 400-599 μm and group III: 600-799 μm. The collagen-embedded follicles was cultured in *in vitro* growth (IVG) medium supplemented with growth factors by 8 treatments: Treatment 1: no supplementation of growth factors as a control, Treatment 2: 50 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF), Treatment 3: 100 ng/mL insulin-like growth factor-I (IGF-I), Treatment 4: 50 ng/mL epidermal growth factor (EGF), Treatment 5: 50 ng/mL bFGF+100 ng/mL IGF-I, Treatment 6: 50 ng/mL bFGF+50 ng/mL EGF, Treatment 7: 100 ng/mL IGF-I +50 ng/mL EGF, Treatment 8:

50 ng/mL bFGF+100 ng/mL IGF-I+50 ng/mL EGF. The follicles were cultured in 4-well dishes for 14 days. The diameter of follicle was measured at day 7 and 14 of cultured.

The results showed that the diameter of follicle at day 7 in group I (200-399 μm) that had been cultured in medium supplemented with bFGF, IGF-I, bFGF+IGF-I, bFGF+EGF, IGF-I+EGF and bFGF+IGF-I+EGF were able to increased follicle diameters but no significantly difference ($P>0.05$), whereas, at day 14, follicles in group I which cultured in medium supplemented with bFGF and bFGF+IGF-I were significantly increased their diameters ($P<0.05$). The results of follicle cultured in group II (400-599 μm) at day 7 showed that follicle which had been cultured in medium supplemented with bFGF+IGF-I had significantly higher increased follicle diameters than other treatments ($P<0.05$). However, at day 14, follicles that had been cultured in medium supplemented with bFGF were able to increased follicle diameters more than other treatments ($P>0.05$). The results of buffalo early antral follicles cultured in group II indicated that follicle which culture in medium supplemented with bFGF and bFGF+IGF-I were able to increase follicle diameters at day 7 and day 14 and this was higher enlargement than those in other treatments. The follicles in groups III (600-799 μm) that had been cultured in medium supplemented with bFGF, IGF-I and bFGF+IGF-I were able to increased follicle diameters at day 7 ($P<0.05$). On the other hand, at day 14, only follicles that had been cultured in medium supplemented with bFGF were able to increase follicle diameters ($P<0.05$).

The result of FDA staining to examine oocytes viability showed that bFGF had higher percentage of viable oocytes than other treatments. Moreover, the culture time had an effect on follicle culture. The follicles in diameter of 200-399 μm required a longer culture time more than 14 day as showed in the result of meiotic stage which arrested at GV stage. Follicles in diameter of 400-599 μm were suitable for culture at 14 days. The result showed that meiotic stage was able to reach MI, whereas culturing follicles in diameter of 600-799 μm required less than 14 days to support the oocytes viability which were found large number of oocytes already lysis because of too long culture period. These results indicated that bFGF and IGF-I were able to improve the growth of early antral buffalo follicles whereas EGF is unable to do that. This work will be essential for *in vitro* cultivation of immature oocytes which can be used for other applications.