

NGHIÊN CỨU XÁC ĐỊNH MÔI TRƯỜNG PHA LOÃNG VÀ PHƯƠNG PHÁP ĐÔNG LẠNH TINH DỊCH CỪ TRONG SẢN XUẤT TINH CỘNG RA

Đào Văn Lập¹, Lê Bá Quế¹, Phùng Thế Hải¹, Lương Anh Dũng¹, Nguyễn Thị Thu Hòa¹, Phạm Vũ Tuấn¹, Lê Thị Loan¹, Phan Văn Hải¹, Kiều Thăng¹ và Đỗ Chiến Thắng²

¹Trung tâm giống gia súc lớn Trung ương; ²Trung tâm nghiên cứu Dê và Thỏ Sơn Tây

Tác giả liên hệ: Đào Văn Lập; Email: daovanlap86@gmail.com

TÓM TẮT

Thí nghiệm được tiến hành trên 600 mẫu tinh dịch của 10 cừu đực giống (05 cừu đực giống Phan Rang và 05 cừu đực giống Dorper) có độ tuổi từ 14-17 tháng tuổi, để xác định môi trường pha loãng tinh dịch và phương pháp đông lạnh tinh dịch cừu trong sản xuất tinh cừu đông lạnh cộng ra. Với ba môi trường pha loãng tinh dịch khác nhau (CUE; TRIS và VNE) và ba phương pháp đông lạnh khác nhau (đông lạnh chậm, nhiệt độ lập trình sẵn - P1; đông lạnh nhanh, nhiệt độ lập trình sẵn - P2 và đông lạnh nhanh, thủ công - P3). Kết quả cho thấy môi trường VNE cho kết quả chất lượng tinh sau giải đông là tốt nhất trong 3 môi trường ($P < 0,05$). Kết quả lần lượt của các chỉ tiêu ở 3 môi trường pha loãng tinh dịch VNE, TRIS và CUE: Hoạt lực sau giải đông là 47,76%; 43,69% và 37,53%; Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau giải đông 22,40%; 23,13% và 24,12%; Tỷ lệ tinh trùng sống sau giải đông đạt 68,54%; 65,63% và 63,05%. Phương pháp đông lạnh nhanh, nhiệt độ lập trình sẵn (P2) có hoạt lực sau giải đông, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau giải đông và tỷ lệ tinh trùng sống sau giải đông tốt nhất trong 3 phương pháp ($P < 0,05$). Phương pháp (P2) cho kết quả hoạt lực tinh trùng sau giải đông đạt 48,66%; tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau giải đông 24,18%; tỷ lệ tinh trùng sống sau giải đông 67,52%.

Từ khóa: Môi trường pha loãng, đông lạnh, tinh dịch cừu, hoạt lực, kỳ hình, sau giải đông.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Thụ tinh nhân tạo (TTNT) trên cừu đã được nghiên cứu và ứng dụng từ những năm 50-60 của thế kỷ XX. Số lượng TTNT trong ngành công nghiệp cừu và tỷ lệ cừu cái được thụ tinh đã tăng mạnh ở Đông Âu, đặc biệt là ở phía đông của Trung Âu, trong những năm đó. Ở Nam Mỹ và châu Úc, TTNT được sử dụng rộng rãi trong các chương trình nhân giống cừu và đem lại nhiều thuận lợi cho người chăn nuôi (Salamon và Maxwell, 2000; Nuti, 2007; Shipley và cs., 2007). Thụ tinh nhân tạo giúp phát triển công tác nhân giống và chọn tạo giống cừu, tránh được sự lây truyền bệnh. Sự phát triển của kỹ thuật bảo quản, đông lạnh tinh dịch của những con đực có giá trị giống tốt, chất lượng hàng đầu cùng với kỹ thuật TTNT sẽ đem đến hiệu quả tốt hơn trong công tác chọn lọc nhân giống vật nuôi.

Ứng dụng của TTNT cừu trong nâng cao năng suất, chất lượng đàn cừu đã được ứng dụng từ lâu trên thế giới, ở Việt Nam kỹ thuật này trên cừu chỉ mới bước đầu được thực hiện. Để nâng cao hiệu quả và phát huy được hết tiềm năng của TTNT thì chất lượng tinh đông lạnh cộng ra là một trong những yếu tố ảnh hưởng hàng đầu. Hai trong những yếu tố quyết định tới chất lượng tinh cừu đông lạnh cộng ra đó chính là môi trường pha loãng và phương pháp đông lạnh trong quá trình sản xuất.

Môi trường pha loãng tinh dịch cừu là dung dịch chứa các chất dinh dưỡng, đặc biệt quan trọng trong trường hợp làm mát, làm lạnh và làm lạnh sâu của tinh dịch trong quá trình sản xuất và đó là yếu tố giúp nâng cao khả năng sống và chịu lạnh của tinh trùng. Trên thế giới có nhiều loại môi trường pha loãng đã được nghiên cứu và sử dụng trong sản xuất tinh cừu đông lạnh.

Phương pháp đông lạnh là một trong những khâu quan trọng của quá trình sản xuất tinh đông lạnh, nó quyết định tới chất lượng tinh đông lạnh sản xuất. Để đánh giá ảnh hưởng của môi trường pha loãng và phương pháp đông lạnh tới chất lượng tinh cừu đông lạnh cộng ra, cũng như tìm ra công thức môi trường pha loãng và phương pháp đông lạnh tinh dịch cừu trong sản

xuất tinh cừu đông lạnh cộng rạ tại Việt Nam, chúng tôi tiến hành “Nghiên cứu xác định môi trường pha loãng và phương pháp đông lạnh tinh dịch cừu trong sản xuất tinh cừu đông lạnh cộng rạ”.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Thí nghiệm được tiến hành trên 600 mẫu tinh dịch cừu (05 cừu đực giống Phan Rang và 05 cừu đực giống Dorper) có độ tuổi từ 14-17 tháng tuổi.

Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Địa điểm nghiên cứu: Trạm Nghiên cứu và Sản xuất tinh đông lạnh Moncada (Tân Lĩnh, Ba Vì, Hà Nội), thuộc Trung tâm Giống gia súc lớn Trung ương.

Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 01/2018 đến 03/2019.

Nội dung nghiên cứu

Xác định môi trường thích hợp pha loãng tinh dịch cừu;

Xác định phương pháp đông lạnh thích hợp đông lạnh tinh dịch cừu.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định môi trường thích hợp pha loãng tinh dịch cừu

Tinh dịch cừu được pha loãng bằng ba môi trường:

Hoá chất	Đơn vị tính	CUE	TRIS	VNE
Natri citrate dihydrate	gam	1,45		
Natri bicarbonate	gam	0,21		
Kali clorua (KCl)	gam	0,04		
Glycine	gam	0,937		
Sulphanilamide	gam	0,03		
TRIS	gam		2,42	1,363
Acid Citric	gam	0,087	1,272	0,762
Fructose	gam			0,375
Glucose	gam	0,3		
Lactose	gam			1,5
Peniciline	UI/ml	100.000	100.000	100.000
Streptomycin	mg/ml	100	100	100
Glycerol	%	7	7	6,5
Raffinose	gam			2,700
Lòng đỏ trứng gà	%	20	20	20
Nước cất (vừa đủ)	ml	100	100	100

Trong đó:

CUE là môi trường của Đại học Cornell - Mỹ (Foote và cs., 1960)

TRIS là môi trường chứa TRIS (Davis và cs., 1963).

VNE là môi trường của Việt Nam do Trung tâm Giống gia súc lớn Trung ương pha chế.

Các môi trường đã được nghiên cứu các tính chất lí, hoá đảm bảo sức sống tinh trùng cừu trong quá trình đông lạnh ($\text{pH} \approx 6,8-7$; áp suất thẩm thấu $\approx 290 \pm 5 \text{ Osm/kg}$ nước).

Phương pháp pha chế môi trường

Mỗi môi trường để pha loãng tinh dịch gồm 2 phần: dung dịch A và dung dịch B.

Pha chế dung dịch A: (dung dịch không có Glycerol):

Cân các loại hoá chất bằng cân điện tử theo công thức cho vào bình 80 ml nước cất 2 lần. Thả viên từ vào và đặt bình lên máy khuấy từ trong vòng 20-30 phút, sao cho các hoá chất được hoà tan trong nước cất. Đặt bình vào xoong nước ấm, đun cách thuỷ đến nhiệt độ 80°C trong 5-10 phút, mục đích để các hoá chất trong bình được hoà tan tuyệt đối. Nhấc bình ra khỏi xoong nước và để dung dịch trong bình nguội đến nhiệt độ phòng (từ $25-30^\circ\text{C}$) và lọc qua giấy lọc sang một bình khác.

Đặt bình có dung dịch trên lên máy khuấy từ và cho 20 ml lòng đỏ trứng gà vào bình rồi để bình lên máy khuấy từ trong vòng 2-3 giờ sao cho lòng đỏ trứng gà được hoà tan trong dung dịch hoá chất. Sau đó cho kháng sinh vào bình, để trên máy khuấy từ 10-15 phút.

Cuối cùng đem lọc hỗn hợp dung dịch qua 4-6 giấy lọc vô trùng rồi cho vào các bình tam giác được bịt kín bằng giấy bạc, bảo quản môi trường ở 4°C ở 24 giờ để cho lắng sau đó gạn phần ở trên sang một bình khác bịt giấy bạc, dán nhãn ghi rõ dung dịch A, bảo quản môi trường ở 4°C (phần lắng ở dưới bỏ đi). Dung dịch A có thể dùng trong 1 tuần.

Pha chế dung dịch B (gồm dung dịch A + Glycerol):

Với môi trường CUE và TRIS: Lấy 86 ml dung dịch A (ở nhiệt độ 4°C) cho vào bình tam giác có thể tích 100 ml cho cục từ vào bình rồi đặt trên máy khuấy từ trong nhiệt độ 4°C , rồi từ từ rót đủ 14 ml Glycerol, cho máy khuấy từ chạy 20 phút để cho môi trường A và dung dịch Glycerol tan đều sau đó bịt giấy bạc dán nhãn, ghi rõ dung dịch B và bảo quản ở 4°C .

Với môi trường VNE: Lấy 87 ml dung dịch A (ở nhiệt độ 4°C) cho vào bình tam giác có thể tích 100 ml cho cục từ vào bình rồi đặt trên máy khuấy từ trong nhiệt độ 4°C rồi từ từ rót đủ 13 ml Glycerol, cho máy khuấy từ chạy 20 phút để cho dung dịch A và dung dịch Glycerol tan đều sau đó bịt giấy bạc dán nhãn, ghi rõ dung dịch B và bảo quản ở 4°C .

Xác định phương pháp đông lạnh thích hợp đông lạnh tinh dịch cừu

Tinh dịch của cừu được pha loãng bằng dung dịch môi trường VNE, đủ thời gian cân bằng ở 4°C thì tiến hành nạp tinh dịch vào cọng rạ bằng máy của hãng Minitub (Đức). Tinh cọng rạ được rải đều trên giá chuyên dụng (có đánh dấu cho từng loại môi trường) tiếp tục để trong tủ bảo ôn ở 4°C trong thời gian 90 phút trước khi tiến hành hạ nhiệt độ (tới -196°C). Với 3 phương pháp đông lạnh khác nhau thì thời gian và tốc độ hạ nhiệt ($^\circ\text{C}/\text{phút}$) từ 4°C xuống đến -196°C là khác nhau, cụ thể:

Phương pháp đông lạnh chậm, nhiệt độ lập trình sẵn (P1): Giảm nhiệt độ từ 4°C xuống -6°C với tốc độ $3^\circ\text{C}/\text{phút}$, từ -6°C xuống -70°C với tốc độ $8^\circ\text{C}/\text{phút}$, từ -70°C xuống -165°C với tốc độ $24^\circ\text{C}/\text{phút}$ sau đó đưa cọng rạ vào nitơ lỏng -196°C . Tổng thời gian đông lạnh 15 phút 18 giây.

Phương pháp đông lạnh nhanh, nhiệt độ lập trình sẵn (P2): Từ 4°C xuống -20°C với tốc độ $10^\circ\text{C}/\text{phút}$. Từ -20°C xuống -160°C với tốc độ $40^\circ\text{C}/\text{phút}$ sau đó đưa cọng rạ vào nitơ lỏng -196°C . Tổng thời gian đông lạnh 5 phút 54 giây.

Phương pháp đông lạnh nhanh, thủ công (P3): Đặt cọng rạ trên khay nằm ngang cách bề mặt nitơ lỏng 4 cm tiến hành giảm nhiệt độ 4°C xuống nhiệt độ - 120°C trong 10 phút, sau đó đưa ngay các cọng rạ ngập trong nitơ lỏng (-196°C). Tổng thời gian đông lạnh 10 phút.

Bảng 1. Bố trí thí nghiệm

Chi tiết	Môi trường pha loãng			Phương pháp đông lạnh		
	CUE	TRIS	VNE	P1	P2	P3
Số cừu đực thí nghiệm	10	10	10	10	10	10
Số mẫu tinh sử dụng/cừu	10	10	10	10	10	10

Các chỉ tiêu theo dõi

Hoạt lực tinh trùng sau giải đông (A%); Tỷ lệ tinh trùng sống ở thời điểm kết thúc cân bằng và thời điểm 24h sau đông lạnh (sau giải đông) (%) được đánh giá thông qua kính hiển vi kết nối với màn hình, bằng phần mềm Andro vision.

Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (K - %): Sử dụng Fucsin 5% nhuộm tinh trùng từ 5 đến 7 phút, phết lam kính và soi trên kính hiển vi có độ phóng đại 400 lần. Đếm số lượng tinh trùng kỳ hình và không kỳ hình, tổng số 500 tinh trùng, rồi tính toán bằng phép tính số học thông thường theo công thức sau:

$$K (\%) = \frac{\text{Số lượng tinh trùng kỳ hình}}{500} \times 100$$

Xử lý số liệu

Các số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) một nhân tố, sử dụng phương pháp kiểm tra Tukey trong phần mềm Minitab 16 nhằm đánh giá sự sai khác giá trị trung bình của các chỉ tiêu theo môi trường pha loãng (P<0,05).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định môi trường pha loãng

Chất lượng tinh trước khi thí nghiệm

Cừu đực giống được khai thác tinh bằng phương pháp sử dụng âm đạo giả, khai thác tinh vào buổi sáng sớm với tần suất khai thác 1 lần/tuần. Kết quả chất lượng tinh dịch cừu trước khi đưa vào thí nghiệm được thể hiện tại Bảng 2.

Bảng 2. Chất lượng tinh dịch cừu trước khi đưa vào thí nghiệm

Môi trường pha loãng	n	Hoạt lực tinh trùng (A%)		Kỳ hình (K%)		Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
CUE	100	87,76	0,18	14,10	0,10	91,53	0,15
TRIS	100	88,35	0,16	13,85	0,12	90,67	0,16
VNE	100	87,95	0,21	14,22	0,14	89,55	0,16
Trung bình		87,98	0,19	14,06	0,12	90,58	0,16

Ghi chú: CUE là môi trường của Đại học Cornell - Mỹ; TRIS là môi trường chứa TRIS; VNE là môi trường của Việt Nam do Trung tâm Giống gia súc lớn Trung ương pha chế.

Qua Bảng 2 cho thấy, các chỉ tiêu của tinh dịch trước khi đưa vào thí nghiệm 3 môi trường là tương đương nhau. Hoạt lực tinh trùng ở các lần khai thác trung bình đạt 87,98%; thấp nhất ở môi trường CUE đạt 87,76% và cao nhất ở môi trường TRIS đạt 88,35%; Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình trung bình đạt 14,06%; cao nhất ở môi trường VNE đạt 14,22% và thấp nhất ở môi trường TRIS đạt 13,85%; Tỷ lệ tinh trùng sống trung bình đạt 90,58%; cao nhất ở môi trường CUE đạt 91,53% và thấp nhất ở môi trường VNE đạt 89,55%; các chỉ tiêu sai khác không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$).

Chất lượng tinh sau khi kết thúc thời gian cân bằng

Ngay sau khi kết thúc thời gian cân bằng chúng tôi tiến hành lấy mẫu kiểm tra hoạt lực tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình và tỷ lệ tinh trùng sống.

Kết quả chất lượng tinh sau thời gian cân bằng được thể hiện tại Bảng 3. Qua Bảng 3 cho thấy hoạt lực tinh trùng và tỷ lệ tinh trùng sống đã có sự thay đổi, chất lượng tinh tốt nhất ở môi trường VNE với hoạt lực tinh trùng sau giải đông đạt 65,45% và tỷ lệ tinh trùng sống đạt 77,10%; thấp nhất ở môi trường CUE tương ứng đạt 53,33% và 65,06% ($P<0,05$). Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở các môi trường pha loãng là tương đương nhau, thấp nhất ở môi trường VNE đạt 17,12% đến môi trường TRIS là 17,65% và môi trường CUE đạt 18,25%; sai khác không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$).

Bảng 3. Chất lượng tinh cừu sau thời gian cân bằng ở các môi trường pha loãng khác nhau

Môi trường pha loãng	n	Hoạt lực tinh trùng (A%)		Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (K%)		Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
CUE	100	53,33 ^b	0,71	18,25	0,18	65,06 ^b	0,56
TRIS	100	64,13 ^a	0,50	17,65	0,19	76,62 ^a	0,55
VNE	100	65,45 ^a	0,50	17,12	0,20	77,10 ^a	0,49

Ghi chú: Các giá trị trung bình mang chữ cái a,b,c khác nhau trong một cột, khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$); CUE là môi trường của Đại học Cornell - Mỹ; TRIS là môi trường chứa TRIS; VNE là môi trường của Việt Nam do Trung tâm Giống gia súc lớn Trung ương pha chế.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đương với kết quả nghiên cứu của Okukpe và cs. (2012), nghiên cứu ảnh hưởng của 4 loại môi trường CUE, môi trường sữa, sữa đậu và sữa đậu kết hợp CUE tới hoạt lực tinh trùng và tỷ lệ tinh trùng sống cho kết quả: Hoạt lực tinh trùng ở thời điểm bắt đầu (buổi sáng) lần lượt đạt 75,45%; 73,69%; 64,89% và 64,72% và ở thời điểm kết thúc (buổi chiều) tương ứng là 40,64%; 40,06%; 22,25% và 36,06%; Tỷ lệ tinh trùng sống ở thời điểm bắt đầu (buổi sáng) lần lượt đạt 81,89%; 81,64%; 74,28% và 64,42% và ở thời điểm kết thúc (buổi chiều) tương ứng là 44,89%; 45,78%; 27,17% và 37,95%. Nur và cs. (2010) nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường bổ sung các chất bảo vệ lạnh đến chất lượng tinh trùng cừu tại Thổ Nhĩ Kỳ cho kết quả hoạt lực tinh trùng sau thời gian cân bằng dao động từ 48,00-60,00%. Recai Kulaksiz và cs. (2012) nghiên cứu các môi trường pha loãng tinh cừu, sau thời gian bảo quản 24 giờ cho kết quả hoạt lực tinh trùng tương ứng dao động từ 48,70%-68,50%.

Trong khi đó, nghiên cứu của Soylu và cs. (2007) cho kết quả hoạt lực tinh trùng sau thời gian cân bằng ở các môi trường có áp suất thẩm thấu khác nhau chỉ đạt từ 37,00% đến 56,00%; trung bình hoạt lực sau thời gian cân bằng đạt 47,10%. Kết quả nghiên cứu của Kemal và cs.

(2010) nghiên cứu cho kết quả hoạt lực tinh trùng cừu sau thời gian cân bằng đạt 73,00%-77,00%. Kết quả này có thể được giải thích do sự khác nhau về giống trong các nghiên cứu.

Chất lượng tinh sau giải đông

Sau khi đông lạnh 24 giờ, chúng tôi tiến hành lấy mẫu 2-3 cọng rạ cho mỗi lô sản xuất để đánh giá chất lượng tinh sau giải đông. Kết quả chất lượng tinh sau giải đông thể hiện tại Bảng 4.

Qua Bảng 4 cho thấy: Hoạt lực tinh trùng sau giải đông là chỉ tiêu hàng đầu để đánh giá chất lượng tinh cọng rạ, kết quả thí nghiệm 3 môi trường pha loãng cho thấy môi trường VNE cho kết quả chất lượng cao nhất đạt 47,76; sau đó đến môi trường TRIS với kết quả đạt 43,69% và thấp nhất là môi trường CUE với hoạt lực tinh trùng sau giải đông đạt 37,53%; sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Bảng 4. Chất lượng tinh cừu đông lạnh cọng rạ ở các môi trường pha loãng khác nhau

Môi trường pha loãng	n	Hoạt lực tinh trùng sau giải đông (A%)		Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau giải đông (K%)		Tỷ lệ tinh trùng sống sau giải đông (%)	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
CUE	100	37,53 ^c	0,54	24,12 ^a	0,18	63,05 ^c	0,37
TRIS	100	43,69 ^b	0,58	23,13 ^b	0,19	65,63 ^b	0,33
VNE	100	47,76 ^a	0,58	22,40 ^b	0,20	68,54 ^a	0,32

Ghi chú: Các giá trị trung bình mang chữ cái a,b,c khác nhau trong một cột, khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); CUE là môi trường của Đại học Cornell - Mỹ; TRIS là môi trường chứa TRIS; VNE là môi trường của Việt Nam do Trung tâm Giống gia súc lớn Trung ương pha chế.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cao hơn Necmettin Tekin và cs. (2006) nghiên cứu trong sản xuất tinh cừu cho thấy, hoạt lực tinh trùng sau giải đông đạt từ 26,5% đến 38,7%; Ergun Akçay và cs. (2012) nghiên cứu 2 môi trường pha loãng (Bioxcell và Andromed) ở các nồng độ tinh trùng khác nhau cho kết quả hoạt lực tinh trùng sau giải đông đạt từ 13,0%-43,0%, cao nhất ở môi trường Andromed ở nồng độ 200 triệu tinh trùng/ml đạt hoạt lực 43,0%. Trong khi đó, Recai Kulaksiz và cs. (2012) nghiên cứu các môi trường pha loãng trong sản xuất tinh cừu đông lạnh cho kết quả hoạt lực sau giải đông ở các môi trường pha loãng chỉ đạt từ 7,0%-21,2%; môi trường TRIS cho kết quả hoạt lực tinh trùng sau giải đông là đạt 16,2%. Marco-Jime'nez và cs. (2005) nghiên cứu trong sản xuất tinh cừu đông lạnh dạng cọng rạ cho thấy, kết quả ở các phương pháp đông lạnh khác nhau, hoạt lực tinh trùng sau giải đông dao động từ 39,6%-40,3%. Soyly và cs. (2007) nghiên cứu ảnh hưởng của các chất bảo vệ lạnh và áp suất thẩm thấu của môi trường pha loãng tới chất lượng tinh cừu đông lạnh cho thấy, môi trường bổ sung glycerol và áp suất thẩm thấu ở các mức khác nhau (350, 375 và 400 mOsm) cho kết quả hoạt lực tinh trùng sau giải đông đạt từ 47,0% đến 51,0%; trung bình là 48,7%. Nicolae và cs. (2014) nghiên cứu tinh cừu đông lạnh cọng rạ, ở các mức nhiệt độ và thời gian giải đông khác nhau cho kết quả hoạt lực tinh trùng sau giải đông cao nhất đạt 45,0%; tỷ lệ tinh trùng sống 52,47% ở nhiệt độ 50°C trong thời gian 30 giây.

Mustafa Numan Bucak và cs. (2013) nghiên cứu xác định ảnh hưởng của raffinose và hypaurine đối với chất lượng tinh sau giải đông cho kết quả hoạt lực tinh trùng cao nhất ở môi trường rafinose đạt 47,5%. Theo Mustafa Numan Bucak và cs. (2013) cho biết Raffinose, một trisaccharide, giống như các loại đường khác, đóng vai trò bảo vệ lạnh bằng cách tương tác

với lipid màng và protein và giảm nguy cơ của tinh thể băng nội bào hình thành, gây mất nước thẩm thấu tế bào trong quá trình bảo quản lạnh. Nó cũng được xác định rằng raffinose đã được sử dụng hầu hết trong sản xuất để ngăn chặn mức độ hình thành nước đá ngoại bào, cung cấp tính ưu trương và tăng cường sự hình thành của một thể thủy tinh hoặc trạng thái vi tinh thể nó cũng cung cấp sự bảo vệ vượt trội của hoạt lực, tính toàn vẹn của màng sinh chất và khả năng thụ tinh của tinh trùng sau giải đông ở một số loài.

Kết quả của chúng tôi thấp hơn nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường pha loãng tới chất lượng tinh cừu tại Ai Cập, Ibrahim và cs. (2018) cho biết, hoạt lực tinh trùng sau giải đông ở các môi trường pha loãng dao động từ 54,0% tới 78,0%. Recai Kulaksiz và cs. (2011), nghiên cứu các môi trường pha loãng tinh dịch: TRIS, môi trường sữa tách kem và môi trường muối Natri cho kết quả hoạt lực tinh trùng sau giải đông ở môi trường TRIS và sữa tách kem (50,0% và 55,0%) cao hơn môi trường muối Natri (37,0%). Nur và cs. (2010) nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường bổ sung các chất bảo vệ lạnh đến chất lượng tinh trùng cừu tại Thổ Nhĩ Kỳ cho thấy hoạt lực tinh trùng sau giải đông cao nhất đạt 51,2% ở môi trường có bổ sung glycerol. Abozar Najafi và cs. (2014) nghiên cứu ảnh hưởng của bổ sung Cysteamine và Ergothionein trong môi trường sữa đậu trong sản xuất tinh cừu cho kết quả hoạt lực tinh trùng cừu dao động từ 49,2% đến 60,2%; tỷ lệ tinh trùng kỳ hình đạt từ 19,3% đến 22,0%.

Bảng 4 cho thấy, khi pha loãng tinh dịch cừu bằng môi trường VNE, tinh cừu đông lạnh có tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau giải đông thấp nhất đạt 22,40%, tiếp theo đến môi trường TRIS đạt 23,13% và cao nhất là môi trường CUE đạt 24,12% ($P < 0,05$).

Kết quả của chúng tôi thấp hơn kết quả nghiên cứu của Recai Kulaksiz và cs. (2012) khi nghiên cứu tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở môi trường TRIS là 55,4%; nằm trong khoảng kết quả nghiên cứu Uysal và Bucak (2007) và Pankaj Kumar và cs. (2019), cho kết quả tinh trùng kỳ hình dao động tương ứng đạt 10,9%-30,1%; 27,1%. Điều này chứng tỏ chất lượng cừu đực giống và môi trường pha loãng được lựa chọn trong thí nghiệm tốt.

Qua Bảng 4 cho thấy, tỷ lệ tinh trùng sống đạt cao nhất ở môi trường VNE đạt 68,54%; môi trường TRIS đạt 65,63% và thấp nhất ở môi trường CUE với tỷ lệ tinh trùng sống đạt 63,05% ($P < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương tự kết quả nghiên cứu của các tác giả về môi trường pha loãng tinh dịch có raffinose. Theo nghiên cứu của Necmettin Tekin và cs. (2006); Uysal và Bucak (2007); Pankaj Kumar và cs. (2019) khi nghiên cứu trong sản xuất tinh cừu cho thấy tỷ lệ tinh trùng sống tương ứng đạt: 52,2%-61,5%; 50,7%-78,6% và 79%.

Bansal và Bilaspuri (2011) cho biết đường raffinose ($C_{18}H_{22}O_{16}.5H_2O$) là một loại đường cao phân tử bao gồm glucose, fructose và galactose, có tính chất ít thẩm qua màng tế bào, đặc biệt có tương tác tốt với màng lipid và protein của tinh trùng. Điều đó cho thấy raffinose trong môi trường pha loãng tinh dịch VNE, có tác dụng chống oxy hóa cao, bảo vệ lạnh cho tinh trùng tốt nên chất lượng tinh sau giải đông đạt kết quả cao.

Xác định phương pháp đông lạnh

Chất lượng tinh dịch của cừu đực giống ở tất cả các lần khai thác trước khi đưa vào thí nghiệm

Kết quả đánh giá chất lượng 300 mẫu tinh dịch cừu trước khi đưa vào thí nghiệm được trình bày tại Bảng 5.

Bảng 5. Chất lượng tinh dịch của cừu đực giống trước khi đưa vào thí nghiệm

Chỉ tiêu	n	Hoạt lực tinh trùng (%)		Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)		Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Phương pháp							
P1	100	88,15	0,19	13,91	0,12	89,83	0,17
P2	100	87,80	0,19	13,89	0,12	90,04	0,17
P3	100	88,35	0,20	13,91	0,11	90,11	0,18
Trung bình		88,10	0,19	13,90	0,12	89,99	0,17

Ghi chú: P1: Phương pháp đông lạnh chậm, nhiệt độ lập trình sẵn; P2: Phương pháp đông lạnh nhanh, nhiệt độ lập trình sẵn; P3: Phương pháp đông lạnh nhanh, thủ công.

Số liệu tại Bảng 5 cho thấy, các chỉ tiêu về chất lượng tinh dịch của cừu đực giống trước khi đưa vào thí nghiệm có chất lượng tương đương nhau. Hoạt lực tinh trùng ở các lần khai thác trung bình đạt 88,10%; cao nhất ở P3 đạt 88,35% và thấp nhất ở P2 đạt 87,80%; Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình trung bình đạt 13,90%; cao nhất ở P3 đạt 13,91% và thấp nhất ở P2 đạt 13,89%; Tỷ lệ tinh trùng sống trung bình đạt 89,99%; cao nhất ở P3 đạt 90,11% và thấp nhất ở P1 đạt 89,83%.

Chất lượng tinh trùng sau giải đông

Trong quá trình đông lạnh, phương pháp đông lạnh tinh dịch làm giảm chức năng của màng tế bào tinh trùng (Watson, 2000), làm tăng quá trình tạo tinh thể băng nội bào của tinh trùng dẫn đến giảm sự vận động của tinh trùng, tăng tỷ lệ tinh trùng kỳ hình và tỷ lệ tinh trùng chết, giảm chất lượng tinh đông lạnh. Tinh dịch sau khi khai thác được đánh giá chất lượng và pha loãng với môi trường VNE sau đó tiến hành đông lạnh, kết quả chất lượng tinh sau giải đông được thể hiện ở Bảng 6.

Bảng 6. Chất lượng tinh trùng cừu sau giải đông ở các phương pháp đông lạnh

Chỉ tiêu	n	Hoạt lực tinh trùng sau (%)		Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)		Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	
		Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Phương pháp							
P1	100	42,56 ^b	0,46	25,16 ^b	0,14	64,24 ^b	0,29
P2	100	48,66 ^a	0,38	24,18 ^c	0,14	67,52 ^a	0,29
P3	100	37,25 ^c	0,34	28,15 ^a	0,12	62,12 ^c	0,28

Ghi chú: Các giá trị trung bình mang chữ cái a,b,c khác nhau trong một cột, khác nhau có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$); P1: Phương pháp đông lạnh chậm, nhiệt độ lập trình sẵn; P2: Phương pháp đông lạnh nhanh, nhiệt độ lập trình sẵn; P3: Phương pháp đông lạnh nhanh, thủ công.

Kết quả Bảng 6 cho thấy, phương pháp đông lạnh nhanh, lập trình sẵn (P2) cho kết quả hoạt lực tinh trùng sau giải đông cao nhất trong 3 phương pháp đông lạnh ($P < 0,05$). Hoạt lực tinh trùng sau giải đông ở 3 phương pháp đông lạnh P1, P2 và P3 lần lượt là 42,56%; 48,66% và 37,25%.

Necmettin Tekin và cs. (2006) nghiên cứu đông lạnh tinh dịch cừu tại Thổ Nhĩ Kỳ, cho thấy phương pháp tự động và có thiết bị lập trình sẵn, với các tốc độ làm lạnh 15°C/phút; 10°C/phút và 5°C/phút cho thấy, hoạt lực tinh trùng sau giải đông tương ứng đạt 30,0%; 33,1% và 32,0%. Nghiên cứu của Diego A. Galarza và cs. (2019) tại Tây Ban Nha, khi đông

lạnh tinh dịch cừ bằng 3 phương pháp đông lạnh là đông lạnh chậm, đông lạnh nhanh 3 bước và đông lạnh nhanh 2 bước, cho thấy hoạt lực tinh trùng sau giải đông đạt tương ứng 44,5%; 47,9% và 61,4%.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi nằm trong khoảng kết quả nghiên cứu của Pankaj Kumar Jha và cs. (2019) khi tác giả nghiên cứu sản xuất tinh cừ đông lạnh thủ công tại Bangladesh, cho kết quả hoạt lực tinh trùng sau giải đông đạt từ 32,5% đến 63,1% và tỷ lệ tinh trùng sống đạt từ 39,8% đến 79,0%.

Kết quả tại Bảng 6 cho thấy, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau giải đông ở phương pháp P2 có kết quả thấp nhất đạt 24,18%; tiếp đến lần lượt là phương pháp P1 và P3 đạt 25,16% và 28,15% ($P < 0,05$); tương tự tỷ lệ tinh trùng sống sau giải đông cao nhất ở phương pháp P2 đạt 67,52% và thấp nhất ở P3 đạt 62,12%, sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Necmettin Tekin và cs. (2006), khi nghiên cứu đông lạnh tinh dịch bằng phương pháp tự động và có thiết bị lập trình sẵn cho thấy, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau đông lạnh 17,7%; 17,7% và 23,0%; tỷ lệ tinh trùng sống sau giải đông đạt 38,0%; 46,0% và 43,2%. Pankaj Kumar Jha và cs. (2019) tại Bangladesh, khi tiến hành đông lạnh tinh dịch cừ bằng phương pháp thủ công thấy rằng, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau giải đông 27,1%.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

Môi trường VNE trong sản xuất tinh cừ đông lạnh cộng rạ cho kết quả chất lượng tinh là tốt nhất ($P < 0,05$). Kết quả lần lượt của các chỉ tiêu ở 3 môi trường pha loãng tinh dịch của Việt Nam do Trung tâm Giống gia súc lớn Trung ương pha chế (VNE), môi trường chứa TRIS (TRIS), môi trường của Đại học Cornell - Mỹ (CUE): Hoạt lực sau giải đông là 47,76%; 43,69% và 37,53%; Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau giải đông 22,40%; 23,13% và 24,12%; Tỷ lệ tinh trùng sống sau giải đông đạt 68,54%; 65,63% và 63,05%.

Phương pháp đông lạnh nhanh, nhiệt độ lập trình sẵn (P2), có tổng thời gian đông lạnh 5 phút 54 giây cho chất lượng tinh trùng sau giải đông tốt nhất trong 3 phương pháp đông lạnh thí nghiệm ($P < 0,05$). Hoạt lực tinh trùng sau giải đông và tỷ lệ tinh trùng sống sau giải đông ở 3 phương pháp đông lạnh P1, P2 và P3 lần lượt là: P1: 42,56% và 64,24%; P2: 48,66% và 67,52%; P3: 37,25% và 62,12%.

Đề nghị

Sử dụng môi trường VNE và phương pháp đông lạnh nhanh, nhiệt độ lập trình sẵn (P2) trong sản xuất được tinh cừ đông lạnh dạng cộng rạ. Sử dụng tinh cừ đông lạnh sản xuất theo môi trường và phương pháp đông lạnh trên để ứng dụng TTNT vào thực tiễn sản xuất nhằm đánh giá tỷ lệ thụ thai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abozar Najafi, Hossein Daghighi Kia, Hossein Mohammadi, Mir Hossein Najafi, Zaynab Zanganeh, Mohsen Sharafi, Felipe Martinez-Pastor and Hamideh Adeldust. 2014. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology*, Volume 69, Issue 1, August 2014, pp. 68-73.
- Bansal, A.K. and Bilaspuri, G.S. 2011. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. Review Article. *Veterinary Medicine Inter.* 7, pp. 1-12. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/686137>
- Davis, I. S., Bratton, R. W. and Foote, R. H. 1963. Livability of bovine spermatozoa at 5, -25, and -85°C in

- TRIS-buffered and citratebuffered yolk-glycerol extenders. *J. Dairy Sci.* 46, pp. 333-336.
- Diego A. Galarza, Antonio Lopez-Sebastian, Henri Woelders, Elizabeth Blesbois and Julian Santiago-Moreno. 2019. Two-step accelerating freezing protocol yields a better motility, membranes and DNA integrities of thawed ram sperm than three-steps freezing protocols. *Cryobiology* 91 (2019), pp. 84-89.
- Ergun Akçay, Recai Kulaksız, Ali Daşkin, Çiğdem Çebi and Koray Tekin. 2012. The effect of different dilution rates on post-thaw quality of ram semen frozen in two different egg yolk free extenders. *Slov. Vet. Res.* 2012; 49 (2), pp. 97-102.
- Foote, R. H., Gray, L. C., Young, D. C. and Dunn, H. O. 1960. Fertility of bull semen stored up to four days at 5°C in 20% egg yolk extenders. *J. Dairy Sci.* 43, pp. 1330-1334.
- Ibrahim S. Abd El-Hamid, Marwa A. Khalifa, Hisham A. Shedeed and Sherif A. Rateb. 2018. Cryosurvival of ram spermatozoa after supplementing the diluent with L-ascorbic acid or α -tocopherol. *Inter J Vet Sci*, 7(4), pp. 197-204.
- Kemal, A.K., Umut CIRIT, Zekeriya NUR, Suleyman BACINOGLU, Serhat PABUCCUOGLU, Ozen Banu OZDAS and Sema BIRLER. 2010. Effect of extender osmolarity, cooling rate, dilution rate and glycerol addition time on post-thaw ram semen characteristics and fertilization. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ.* 36 (2), pp. 33-46.
- Marco-Jime'nez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J.S. and Viudes-de-Castro, M.P. 2005. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology* 64 (2005), pp. 1756-1765.
- Mustafa Numan Bucak, Nazan Keskin, Mehmet Taspınar, Kenan Cayan, Nuri Baspınar, Mihai C. Cenariu, Ali Bilgili, Caner Ozturk, Ahmet Nuri Kursunlu. 2013. Raffinose and hypotaurine improve the post-thawed Merino ram sperm parameters. *Cryobiology* 67 (2013), pp. 34-39.
- Necmettin Tekin, Ongun Uysal, Ergun Akçay and İlker Yavaş. 2006. Farklı taurin dozlarının ve dondurma hızının koç spermasının dondurulması üzerine etkileri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 53, pp. 179-184
- Nicolae, D., Zamfirescu Stela, Coprean Dragomir and Anghel Andreea Hortanse. 2014. Effect of thawing time and temperature variation on the quality of frozenthawed ram semen. *Romanian Biotechnological Letters*, Vol. 19, No. 1.
- Nur, Z., Zik, B., Ustuner, B., Sagirkaya, H. and Ozguden, C.G. 2010. Effects of different cryoprotective agents on ram sperm morphology and DNA integrity, *Theriogenology* 73 (2010), pp. 1267-1275.
- Nuti, I. 2007. Techniques for artificial insemination of goats. In: Youngquist, R. S. and Threlfall, W. R. (eds) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd edition. SaundersElsevier, St. Louis, MO, pp. 529-534.
- Okukpe, K.M., Adeloye, A.A., Adeyemi, K.D., Olatunde, O.A., Ojo, V. and Sola-Ojo, F.E. 2012. Effects of Extender Types on Ram Semen Collected with Electroejaculator in a Tropical Environment. *Asian Journal of Animal Sciences*, 6, pp. 249-255.
- Pankaj Kumar Jha, Golam Shahi Alam, M., Abdullah AL. Mansur, Nazmun Naher, Taohidul Islam, Musharraf Uddin Bhuiyan and Farida Yeasmin Bari. 2019. Cryopreservation of Bangladeshi ram semen using different diluents and manual freezing techniques. *Cryobiology*, 89, August 2019, pp. 35-41.
- Paulenz, H., Lennart Söderquist, Rosaura Pérez-Pé, and Andersen Berg, K. 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57(2), pp. 823-36.
- Salamon, S. and Maxwell, M. C. 2000. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62, pp. 77-111.
- Shipley, C. F. B., Brian, C., Buckrell, B. C., Mylne, M. J. A., Pollard, J. and Hunton, J. R. 2007. Artificial insemination and embryo transfer in sheep. In: Youngquist, R. S. and Threlfall, W. R. (eds) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd edition. SaundersElsevier, St. Louis, MO, pp. 629-641.
- Recai Kulaksiz, Mustafa Numan Bucak, Ergun Akçay, Fatih Sakin, Ali Daşkin and Ahmet Ateşşahin. 2011. The Effects of Different Extenders and Myo-Inositol on Post-thaw Quality of Ram Semen. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 17 (2), pp. 217-222.

- Recai Kulaksiz, Çiğdem çebi and Ergun Akçay. 2012. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4°C. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2012; 36(2), pp. 177-182.
- Soylu, M.K., Nur, Z., Ustuner, B., Dogan, I., Sagirkaya, H., Gunay, U. and Ak, K. 2007. Effects of various cryoprotective agents and extender osmolality on post-thaw ram semen. Bull Vet Inst Pulawy 2007; 51, pp. 241-246.
- Uysal, O. and Bucak, M. N. 2007. Effects of Oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Cysteine and Lycopen on the Quality of Frozen-Thawed Ram Semen. Acta Vet. Brno 2007, 76, pp. 383-390.
- Watson, P.F. 2000. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci. 2000, 60-61, pp. 481-492.

ABSTRACT

Research to determine dilution medium and methods of freezing sheep semen in the production rams frozen semen

The experiment was conducted on 600 semen samples of 10 rams (05 Phan Rang and 05 Dorper rams) which are 14-17 months, to determine the extenders and the freezing semen methods to produce ram frozen semen. There are three different extenders (CUE; TRIS and VNE), and three different freezing methods (slow freezing, programmed temperature - P1; quick freezing, programmable temperature - P2 and quick freezing, manually - P3). The results showed that the VNE extender gives the best quality of sperm after thawing ($P < 0.05$). Then the results of TRIS and CUE, respectively. Namely motility was 47.76%; 43.69% and 37.53%; abnormal sperm was 22.40%; 23.13% and 24.12%; The rate of live sperm reached 68.54%; 65.63% and 63.05%. The quick freezing method, programmed temperature (P2) has the best sperm quality after thawing such as motility, the rate of abnormal sperm and live sperm ($P < 0.05$). Method P2 showed the post-thaw semen quality result that motility reached 48.66%; the rate of abnormal sperm was 24.18%; rate of live sperm was 67.52%.

Keywords: *Dilution medium, freezing method, semen, ram, thawing, sperm motility, abnormal sperm*

Ngày phân biện đánh giá: 26/11/2020

Ngày chấp nhận đăng: 22/01/2021

Người phân biện: *Hội đồng Khoa học và Công nghệ giai đoạn 2018-2020 _ Viện Chăn nuôi*