

ẢNH HƯỞNG CỦA VIỆC BỔ SUNG VITAMIN E VÀO MÔI TRƯỜNG BẢO QUẢN ĐẾN CHẤT LƯỢNG TINH DỊCH GÀ NHIỀU CỤA PHÚ THỌ

Bùi Thị Hoàng Yến, Đặng Hoàng Lâm và Nguyễn Thị Hà Phương

Viện Nghiên cứu ứng dụng và phát triển - Đại học Hùng Vương

Tác giả liên hệ: Bùi Thị Hoàng Yến. Tel: 0916.473.376; Email: hoangyen.vp@gmail.com.vn

TÓM TẮT

Thí nghiệm tiến hành nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung vitamin E vào môi trường bảo quản lên chất lượng tinh dịch gà nhiều cựa Phú Thọ tại 24 và 48 giờ sau bảo quản. Tinh dịch thu được được bảo quản ở 4°C bởi môi trường có bổ sung vitamin E ở các nồng độ khác nhau (0, 6, 9, 15 µg/ml). Các chỉ tiêu hoạt lực tinh trùng bao gồm hoạt động khối và tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng, tỷ lệ sống, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình được đánh giá ở 0, 24, 48 giờ sau bảo quản. Kết quả thí nghiệm cho thấy hoạt lực của tinh trùng bảo quản tăng lên rõ rệt khi bổ sung 9 µg vitamin E/ml môi trường bảo quản sau 24 và 48 giờ. Cụ thể, hoạt động khối của tinh dịch tăng 7,5% và 23%, tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng tăng 11,28% và 28,32% so với lô đối chứng (Lô 1) tại 24 và 48 giờ sau bảo quản. Tỷ lệ sống của tinh trùng đạt cao nhất khi môi trường bảo quản được bổ sung vitamin E ở nồng độ 9 µg/ml (3,5% và 2,5% so với Lô 1 ở thời điểm 24 và 48 giờ). Tuy nhiên, không có sự sai khác về mặt thống kê khi so sánh tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh dịch bảo quản ở các nồng độ bổ sung khác nhau. Tỷ lệ thụ tinh của tinh dịch bảo quản sau 24 giờ bởi các môi trường bổ sung nồng độ vitamin E khác nhau không khác nhau ở tuần 1 sau thụ tinh nhưng sang tuần thứ 2 thì có sự sai khác ($P < 0,05$). Sau 48 giờ bảo quản, tỷ lệ thụ tinh đạt cao nhất khi bổ sung 9 µg vitamin E/ml môi trường bảo quản (62,15% ở tuần thứ nhất, 35,27% ở tuần thứ hai sau thụ tinh) so với lô ĐC (45,76 % và 11,68% ở lần lượt tuần 1 và 2 sau thụ tinh). Kết quả cho thấy, bổ sung vitamin E ở nồng độ 9 µg/ml môi trường đã nâng cao chất lượng tinh dịch và kéo dài thời gian bảo quản tinh dịch gà nhiều cựa Phú Thọ khi bảo quản dạng lỏng.

Từ khoá: Gà nhiều cựa Phú Thọ, tinh dịch, bảo quản lỏng, vitamin E, chất chống oxy hoá

ĐẶT VẤN ĐỀ

Gà nhiều cựa Phú Thọ là giống gà bản địa quý của nước ta. Giống gà này đặc sắc bởi hai chân có số lượng cựa nhiều hơn các giống gà khác, thường từ 4-8 cựa, có khi 9 cựa. Đặc biệt đây là giống gà có chất lượng thịt thơm ngon. Bên cạnh đó, giống gà nhiều cựa Phú Thọ này còn mang ý nghĩa tâm linh gắn liền với sự tích lịch sử Vua Hùng nên nó còn có giá trị về mặt văn hoá, lịch sử (Nguyễn Hoàng Thịnh và cs., 2016).

Tuy nhiên, hiện nay số lượng gà này đang ngày một giảm do chủ yếu được người dân nuôi theo phương thức tự nhiên, không chú trọng đến kỹ thuật và phòng bệnh, khả năng sinh sản còn thấp (Nguyễn Hoàng Thịnh và cs., 2016). Vì vậy, mà giống gà này được đưa vào danh mục nguồn gen vật nuôi quý hiếm cần được bảo tồn (Thông tư 06/2012/TT - BNNPTNT). Áp dụng tiến bộ kỹ thuật trong sinh sản như kỹ thuật thụ tinh nhân tạo và pha loãng, bảo tồn tinh dịch có thể nâng cao khả năng sinh sản từ đó giúp bảo tồn, nhân nhanh và phát triển giống gà này. Yếu tố quyết định đến hiệu quả thụ tinh trong thụ tinh nhân tạo là vấn đề liên quan đến chất lượng tinh dịch bảo quản.

Tinh dịch thông thường được bảo quản bởi hai phương pháp: bảo quản dạng lỏng (liquid storage) và bảo quản đông lạnh (frozen semen) (Donoghue và Wishart, 2000). Trên gia cầm, tinh dịch chủ yếu được bảo quản ở dạng lỏng vì phương pháp này yêu cầu quy trình đơn giản, tỷ lệ thụ tinh cao và giá thành thấp khi so sánh với bảo quản đông lạnh. Tuy nhiên, thời gian sử dụng của tinh dịch bảo quản lỏng ngắn, chất lượng tinh dịch giảm sau 24 giờ bảo quản (Douard và cs., 2000).

Một trong những yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng tinh dịch sau bảo quản là quá trình peroxide hoá lipid – một thành phần chính cấu tạo nên màng tế bào tinh trùng (Niu và Wang,

2009), dẫn đến cấu trúc, chức năng của tinh trùng không được bảo toàn làm giảm chất lượng tinh trùng (Engel và cs., 1999; Halliwell và Chirico, 1993). Nguyên nhân dẫn đến quá trình peroxide hoá lipid là do sự sản sinh ra các gốc tự do (ROS) trong quá trình hô hấp (Pagl và cs., 2006) cũng như khi tinh trùng chịu các yếu tố gây stress như yếu tố pha loãng, nhiệt độ bảo quản (Wang và cs., 1997). Trong tự nhiên, tinh trùng cần có các ROS tham gia vào quá trình vận động, hoạt hoá và phản ứng acrosome trong quá trình thụ tinh (Sharma và Agarwal, 1996). Tuy nhiên, khi lượng ROS sinh ra nhiều quá sẽ gây ảnh hưởng xấu tới chức năng của tinh trùng, từ đó gây giảm chất lượng tinh dịch bảo quản (Agarwal và cs., 2003).

Để nâng cao chất lượng tinh dịch bảo quản cần thiết phải hạn chế quá trình peroxide hoá lipid xảy ra, hơn nữa là hạn chế lượng ROS được sinh ra trong quá trình bảo quản. Các chất chống oxy hoá như vitamin A, E, C, carotenoid,... là những chất có khả năng trung hoà và ngăn ngừa sự hình thành các gốc tự do. Giả thiết đặt ra là liệu bổ sung các chất chống oxy hoá vào môi trường bảo quản có làm tăng hiệu quả bảo quản tinh dịch của giống gà nhiều cựa Phú Thọ hay không?

Xuất phát từ thực tiễn đó, chúng tôi tiến hành đề tài đánh giá “*Ảnh hưởng của việc bổ sung vitamin E vào môi trường bảo quản đến chất lượng tinh dịch gà nhiều cựa Phú Thọ*”

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Thí nghiệm thực hiện trên 12 gà trống giống gà nhiều cựa Phú Thọ 28 tuần tuổi, khối lượng trung bình 2,5kg. Gà được nhốt trong lồng riêng, thức ăn và nước uống tự do theo nhu cầu.

Môi trường bảo quản tinh dịch: môi trường Lake (5.6 mM Magne acetate; 113.5 mM Sodium Glutamat; 13 mM Potasium acetate; 44.4 mM D-glucose; 62.2 mM sodium acetate; Gentamicin sulfate 0.001gr (0.1ml) có bổ sung vitamin E ở các nồng độ khác nhau.

Gà mái: 12 con (42 tuần tuổi) dùng để đánh giá khả năng thụ tinh của tinh dịch sau bảo quản ở lô đối chứng và lô bổ sung vitamin E có chất lượng tinh dịch sau bảo quản tốt nhất.

Hoá chất phục vụ thí nghiệm được cung cấp bởi Nacalai – Kyoto – Nhật Bản.

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: Thí nghiệm được thực hiện từ tháng 3 đến tháng 12 năm 2019.

Địa điểm: Trung tâm Nông nghiệp hữu cơ – Viện nghiên cứu ứng dụng và phát triển.

Phòng thí nghiệm Khoa học động vật – Đại học Hùng Vương.

Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm

Gà trống được khai thác tinh dịch 3 lần/tuần trong 4 tuần thí nghiệm theo phương pháp massage của Burrows và Quinn (1937) để đánh giá chất lượng tinh dịch theo cá thể để đánh giá chất lượng tinh dịch gà thí nghiệm (thể tích, hoạt động khối, tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng, tỷ lệ sống, tỷ lệ kỳ hình).

Đánh giá chất lượng tinh dịch bảo quản: Tinh dịch được khai thác theo phương pháp massage của Burrows và Quinn (1937), hỗn hợp tinh dịch thu được trộn đều và chia thành 4 lô sử dụng môi trường có bổ sung vitamin E ở các nồng độ khác nhau:

Lô 1 (Đối chứng): Môi trường Lake không bổ sung vitamin E

Lô 2, 3, 4: Môi trường Lake có bổ sung vitamin E với nồng độ 6 µg/mL, 9 µg/mL và 15 µg/mL

Tinh dịch được pha loãng theo tỷ lệ 1 tinh dịch : 3 môi trường. Mẫu tinh dịch được bảo quản ở nhiệt độ 4°C. Các chỉ tiêu chất lượng tinh dịch sau bảo quản được đánh giá tại các thời điểm 0, 24 và 48 giờ sau bảo quản.

Thí nghiệm đánh giá tỷ lệ thụ tinh được thực hiện trên 12 gà mái (6 mái/lô/thời điểm bảo quản).

Chỉ tiêu nghiên cứu và phương pháp xác định

Thể tích tinh dịch được đo bằng ống eppendorf 1,5ml có chia vạch 0,1ml.

pH tinh dịch được đo bằng máy đo pH điện tử (pH 6203 - China)

Nồng độ tinh trùng (tỷ/ml): Dùng micropipet hút 5 µl tinh dịch vào ống eppendorf có thể tích 1,5ml, cho thêm 495 µl NaCl 3% rồi lắc nhẹ để trộn đều. Nhỏ 10 µl dung dịch đã pha loãng vào mép buồng đếm Neubauer đã được đặt sẵn lamén, nghiêng buồng đếm lên kính hiển vi quang học. Đếm tinh trùng bằng vật kính 40x, đếm 3 lần rồi lấy giá trị trung bình. Công thức tính nồng độ tinh trùng là $C = N \times 0,005$ (C: tỷ tinh trùng/ml, N: tổng số tinh trùng đếm được ở 5 ô trung bình (4 ô ở góc và 1 ô ở giữa) của ô lớn ở chính giữa buồng đếm).

Hoạt động khối của tinh trùng (mass activity): Hoạt động khối của tinh trùng là chỉ tiêu đánh giá hoạt lực thông qua đánh giá sự vận động của tinh trùng, được đánh giá theo phương pháp mô tả bởi Herman và Madden (1993). Quan sát dưới kính hiển vi độ phóng đại 100 lần ở 37°C (sử dụng bàn sưởi âm phiên kính), quan sát ít nhất 3 vi trường và đánh giá thang điểm từ 0 đến 5:

0 = không có tinh trùng vận động

3 = 40 đến 60% tinh trùng vận động

1 = 1 đến 20% tinh trùng vận động

4 = 60 đến 80% tinh trùng vận động

2 = 20 đến 40% tinh trùng vận động

5 = 80 đến 100% tinh trùng vận động

Tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng (progressive motility): Được thực hiện theo phương pháp mô tả bởi Herman và Madden (1993). Tinh dịch được pha loãng bằng dung dịch PBS (Phosphate Buffered Saline) và quan sát trên kính hiển vi độ phóng đại 400 lần. Tinh trùng tiến thẳng là những tinh trùng vận động thẳng tiến về phía trước. Đánh giá tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng (\%)} = \frac{\text{Tổng số tinh trùng tiến thẳng}}{\text{Tổng số tinh trùng vận động}} \times 100$$

Tỷ lệ tinh trùng sống được đánh giá theo phương pháp mô tả bởi Mortimer (1994). Tinh trùng được nhuộm màu bởi dung dịch Trypan Blue 0,4%. Tinh trùng bắt màu xanh là tinh trùng chết, tinh trùng không bắt màu là tinh trùng sống. Tỷ lệ tinh trùng sống được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = 100 - \frac{\text{Tổng số tinh trùng bắt màu xanh}}{\text{Tổng số tinh trùng quan sát được}} \times 100$$

Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình: Tinh dịch được pha loãng bằng dung dịch Buffered Glutaraldehyde 3% nhằm có tác dụng giết chết tinh trùng. Quan sát trên kính hiển vi độ phóng đại 400 lần.

Quan sát tinh trùng kỳ hình là những tinh trùng có hình dạng bất thường như: không đuôi, 1 đầu 2 đuôi hoặc 2 đầu 1 đuôi, đứt đầu, gãy đuôi, đầu quá to,... Quan sát đến khi tổng số tinh trùng đếm được lớn hơn 300 con. Tỷ lệ kỳ hình được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (\%)} = \frac{\text{Tổng số tinh trùng kỳ hình}}{\text{Tổng số tinh trùng quan sát}} \times 100$$

Khả năng thụ tinh của tinh dịch sau bảo quản 24 và 48 giờ của lô ĐC và lô thí nghiệm có chất lượng tinh dịch tốt nhất được đánh giá bằng việc thụ tinh nhân tạo cho gà mái. Mỗi lô 6 gà mái, thụ tinh nhân tạo cho gà vào 3 giờ chiều theo phương pháp của Quinn và Burrows (1936). Trứng được thu từ ngày thứ 2 kể từ ngày thụ tinh, bảo quản ở nơi thoáng mát sau 1 tuần cho vào máy ấp. Trong khoảng thời gian 05 ngày sau ấp tiến hành ấp, đập trứng kiểm tra sự phát triển của phôi

$$\text{Tỷ lệ thụ tinh (\%)} = \frac{\text{Tổng số trứng có phôi}}{\text{Tổng số trứng mang ấp}} \times 100$$

Xử lý số liệu

Xử lý số liệu bằng phương pháp so sánh phương sai một nhân tố (ANOVA One Way) trên phần mềm SPSS 20.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đánh giá chất lượng tinh dịch gà nhiều cựa Phú Thọ

Kết quả đánh giá chất lượng tinh dịch gà nhiều cựa Phú Thọ trong thí nghiệm được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Chất lượng tinh dịch gà nhiều cựa Phú Thọ

| Số hiệu | n | Chỉ tiêu theo dõi | | | | | | |
|-----------|----|-------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| | | Thể tích (ml) | pH | Nồng độ (tỷ/ml) | Hoạt động khối | Tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng (%) | Tỷ lệ sống (%) | Tỷ lệ kỳ hình (%) |
| 1 | 12 | 0,35±0,03 | 7,29±0,03 | 3,37±0,08 | 4,15±0,03 | 87,83±1,60 | 87,63±1,56 | 6,97±1,17 |
| 2 | 11 | 0,45±0,02 | 7,29±0,02 | 3,77±0,10 | 4,25±0,05 | 89,17±2,79 | 88,50±1,60 | 7,60±1,10 |
| 3 | 12 | 0,40±0,02 | 7,30±0,04 | 3,92±0,06 | 3,85±0,07 | 88,93±2,60 | 87,83±2,60 | 8,38±2,14 |
| 4 | 12 | 0,39±0,02 | 7,30±0,04 | 4,21±0,15 | 4,20±0,07 | 89,50±1,43 | 88,65±3,52 | 7,38±1,14 |
| 5 | 10 | 0,44±0,02 | 7,32±0,04 | 4,15±0,16 | 4,10±0,07 | 90,00±3,48 | 87,83±2,49 | 9,52±3,23 |
| 6 | 12 | 0,40±0,02 | 7,30±0,04 | 3,55±0,11 | 4,30±0,07 | 8,50±2,43 | 88,75±1,47 | 7,55±2,19 |
| 7 | 11 | 0,43±0,01 | 7,33±0,06 | 3,65±0,06 | 3,95±0,07 | 90,50±3,49 | 86,80±2,49 | 10,35±2,13 |
| 8 | 12 | 0,40±0,02 | 7,36±0,05 | 3,82±0,11 | 4,15±0,07 | 88,72±1,43 | 90,05±3,46 | 7,68±1,11 |
| 9 | 11 | 0,35±0,01 | 7,20±0,04 | 3,91±0,04 | 4,30±0,02 | 89,63±3,37 | 89,65±2,49 | 8,50±3,07 |
| 10 | 10 | 0,45±0,01 | 7,20±0,04 | 3,62±0,08 | 4,20±0,03 | 88,50±2,15 | 87,86±3,46 | 8,85±3,16 |
| 11 | 12 | 0,38±0,02 | 7,20±0,04 | 4,15±0,09 | 4,15±0,03 | 90,05±2,62 | 90,00±2,43 | 7,60±2,16 |
| 12 | 12 | 0,37±0,02 | 7,23±0,06 | 4,05±0,08 | 4,20±0,42 | 88,53±1,33 | 89,64±1,49 | 9,50±2,07 |
| TB | | 0,40±0,01 | 7,28±0,01 | 3,85±0,04 | 4,15±0,02 | 89,16±2,29 | 88,60±2,42 | 8,32±2,05 |

Qua Bảng 1 cho thấy, cả 12 gà nhiều cựa Phú Thọ trong thí nghiệm đều cho chất lượng tinh dịch tốt. Thể tích trung bình đạt 0,4ml/lần xuất tinh, nồng độ tinh trùng đạt 3,85 tỷ tinh trùng/ml, hoạt động khô của tinh dịch đạt 4,15 điểm, tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng và tỷ lệ sống của tinh dịch gà nhiều cựa đạt lần lượt 89,16 % và 88,60%, tỷ lệ kỳ hình trung bình là 8,32%. Kết quả cho thấy gà nhiều cựa Phú Thọ trong thí nghiệm đều cho chất lượng tinh dịch tốt tương đương một số giống gà nội như gà Hồ (Đỗ Thị Huế và cs., 2015), gà Đông Tảo (Đỗ Thị Huế và cs., 2017), gà Ri (Nguyễn Hoài Nam và cs., 2012).

Ảnh hưởng của bổ sung vitamin E lên chất lượng tinh dịch bảo quản

Hoạt động khô của tinh trùng và tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng sau bảo quản

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của bổ sung vitamin E lên hoạt động khô của tinh và tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng sau bảo quản được thể hiện ở Bảng 2 và Bảng 3.

Bảng 2. Hoạt động khô của tinh trùng (mass activity) sau bảo quản

| Thời gian bảo quản | Lô thí nghiệm (Mean ± SE) | | | | | P Thời gian |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------|
| | n | Lô 1 | Lô 2 | Lô 3 | Lô 4 | |
| 0 giờ | 24 | 4,28 ± 0,13 | 4,35 ± 0,12 | 4,37 ± 0,14 | 4,30 ± 0,14 | |
| 24 giờ | 24 | 4,00 ± 0,31 ^b | 4,10 ± 0,33 ^{ab} | 4,30 ± 0,19 ^a | 4,10 ± 0,31 ^{ab} | <0,0001 |
| 48 giờ | 24 | 2,60 ± 0,54 ^b | 2,80 ± 0,62 ^{ab} | 3,20 ± 0,49 ^a | 2,70 ± 0,52 ^{ab} | |

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng mang chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$);
P_{Thời gian}: Ảnh hưởng của thời gian bảo quản lên chất lượng tinh dịch

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy: Thời gian bảo quản càng kéo dài, sức vận động của tinh trùng càng giảm ($P < 0,0001$), đặc biệt là sau 24 giờ bảo quản (Douard và cs., 2000). Bổ sung vitamin E vào môi trường bảo quản có thể làm tăng hoạt động khô của tinh trùng ở cả 24 và 48 giờ sau bảo quản so với lô đối chứng đối chứng (Lô 1). Hoạt động khô tinh dịch đạt cao nhất khi bổ sung vitamin E ở nồng độ 9 µg/mL (Lô 3) ở cả sau 24 và 48 giờ sau bảo quản.

Qua Bảng 3 ta thấy, thời gian bảo quản càng kéo dài tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng càng giảm ($P < 0,0001$). Bổ sung vitamin E ở nồng độ 9 µg/mL cho tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng cao nhất ở cả 24 và 48 giờ sau bảo quản ($P < 0,05$). Bổ sung vitamin E ở nồng độ cao hơn (15 µg/mL) cũng không làm tăng tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng sau bảo quản khi so sánh với lô đối chứng ($P > 0,05$).

Bảng 3. Ảnh hưởng của bổ sung vitamin E lên tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng của tinh dịch sau bảo quản

| Thời gian bảo quản | Lô thí nghiệm (Mean ± SE) | | | | | P Thời gian |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|
| | n | Lô 1 | Lô 2 | Lô 3 | Lô 4 | |
| 0 giờ | 24 | 89,7 ± 1,21 | 90,1 ± 1,30 | 91,0 ± 1,04 | 91,1 ± 1,09 | |
| 24 giờ | 24 | 72,7 ± 1,41 ^b | 74,9 ± 1,45 ^b | 80,9 ± 1,44 ^a | 73,2 ± 2,15 ^b | <0,0001 |
| 48 giờ | 24 | 45,2 ± 3,06 ^b | 46,7 ± 4,28 ^b | 58,0 ± 3,00 ^a | 45,2 ± 3,19 ^b | |

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng mang chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$);
P_{Thời gian}: Ảnh hưởng của thời gian bảo quản lên chất lượng tinh dịch

Chất lượng tinh dịch (hoạt động khô, tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng) bảo quản giảm rõ rệt sau 24h bảo quản (Douard và cs., 2000).

Nguyên nhân của sự giảm sút chất lượng tinh dịch là do sự peroxide hoá lipid màng tế bào tinh trùng bởi các gốc tự do sinh ra trong quá trình bảo quản (Halliwell và Chirico, 1993). Quá trình peroxide hoá lipid màng tế bào tinh trùng đã gây ra sự thay đổi tính thấm thấu màng tế bào từ đó trực tiếp ảnh hưởng cấu trúc và chức năng màng tế bào, ảnh hưởng lên chất lượng tinh trùng bảo quản.

Yếu tố gây kích hoạt chuỗi phản ứng peroxide hoá này là các gốc tự do sinh ra trong quá trình bảo quản tinh dịch như $LOO\cdot$ (Surai và cs., 2001). Vitamin E (α -Tocopherol) là một chất chống oxy hoá có khả năng trung hoà gốc tự do $LOO\cdot$ tạo ra gốc ổn định $LOOH$, do đó gốc tự do $LOO\cdot$ không thể tiếp tục tấn công lipid của màng tế bào tinh trùng, giúp tinh trùng giữ ổn định về cấu trúc và chức năng (Niki và cs., 1991). Hơn nữa, vitamin E là một chất chống oxy hoá có thể hoà tan trong lipid, do đó nó có thể dễ dàng thấm qua màng tế bào tinh trùng để dọn dẹp các gốc tự do (Aitken và Clarkson, 1988). Do đó, việc bổ sung vitamin E vào môi trường bảo quản ở nồng độ thích hợp có thể làm tăng chất lượng tinh dịch sau bảo quản.

Bổ sung ở nồng độ thấp hơn ($6 \mu\text{g/mL}$) cũng làm tăng hoạt động khối và tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng của tinh dịch sau bảo quản nhưng không đáng kể ($P>0,05$). Ngược lại, khi bổ sung vitamin E ở nồng độ cao hơn ($15 \mu\text{g/mL}$) cũng không làm tăng hoạt động khối của tinh trùng bảo quản, mà có xu hướng giảm hơn so với bổ sung $9 \mu\text{g/mL}$. Ảnh hưởng của bổ sung vitamin E phụ thuộc vào nồng độ bổ sung (Al-Daraji., 2000; Hu và cs., 2011). Cao và Cutler (1993) đã kết luận rằng vitamin E ở nồng độ cao nó hoạt động như một chất kích thích oxy hoá, do đó không có tác dụng ngăn chặn sự oxy hoá xảy ra. Hơn nữa, nồng độ vitamin E cao có thể làm thay đổi tính năng của màng tế bào tinh trùng hoặc quá trình ạo ra một số ROS cần thiết cho quá trình thụ tinh (Dalvit và cs., 1998). Từ đó, bổ sung nồng độ cao vitamin E có thể gây hại cho tinh trùng trong quá trình bảo quản. Khi so sánh kết quả nghiên cứu của đề tài, chúng tôi thấy có sự tương đồng về ảnh hưởng của bổ sung vitamin E và nồng độ bổ sung với kết quả nghiên cứu của Al-Daraji (2000).

Ảnh hưởng của bổ sung vitamin E lên tỷ lệ tinh trùng sống sau bảo quản

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của bổ sung vitamin E lên tỷ lệ tinh trùng sống sau bảo quản được thể hiện ở Bảng 4

Bảng 4. Tỷ lệ sống của tinh trùng sau bảo quản bằng môi trường thí nghiệm

| Thời gian bảo quản | Lô thí nghiệm (Mean \pm SE) | | | | | P Thời gian |
|--------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------|
| | n | Lô 1 | Lô 2 | Lô 3 | Lô 4 | |
| 0 giờ | 24 | 90,0 \pm 0,88 | 89,4 \pm 0,71 | 89,6 \pm 0,83 | 89,7 \pm 0,75 | |
| 24 giờ | 24 | 84,7 \pm 1,18 ^b | 84,1 \pm 0,77 ^b | 88,2 \pm 0,66 ^a | 83,7 \pm 1,16 ^b | <0,0001 |
| 48 giờ | 24 | 81,4 \pm 1,58 | 81,7 \pm 1,72 | 83,9 \pm 1,13 | 81,2 \pm 1,10 | |

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng mang chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$); $P_{\text{Thời gian}}$: Ảnh hưởng của thời gian bảo quản lên chất lượng tinh dịch

Kết quả ở Bảng 3 cho thấy, tỷ lệ tinh trùng sống giảm rõ rệt khi thời gian bảo quản kéo dài ($P<0,0001$). Lô bổ sung $9 \mu\text{g/mL}$ vitamin E có tỷ lệ tinh trùng sống cao nhất sau 24 giờ bảo quản ($P<0,05$). Sau 48 giờ bảo quản, tỷ lệ sống của tinh trùng có xu hướng cao nhất ở Lô 3 ($P=0,08$).

Vitamin E là chất chống oxy hoá có tác dụng ngăn chặn sự hình thành các gốc tự do sinh ra trong quá trình bảo quản tinh dịch (Surai và cs., 2001) do đó, cấu trúc và chức năng màng tế

bào tinh trùng được bảo vệ khỏi sự tấn công của các gốc tự do (Niki và cs., 1991). Do đó, tỷ lệ sống của tinh trùng sau bảo quản 24h và 48h cũng được tăng lên. Tương tự như hoạt lực, tỷ lệ sống của tinh trùng cũng chịu ảnh hưởng bởi nồng độ vitamin E bổ sung (Hu và cs., 2011). Bổ sung vitamin E ở nồng độ cao (15 µg/mL) không làm tăng tỷ lệ sống của tinh trùng bảo quản (Al-Daraji, 2000; Cao và Cutler, 1993).

Ảnh hưởng của bổ sung vitamin E lên tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh dịch sau bảo quản

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của bổ sung vitamin E lên tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau bảo quản thể hiện ở Bảng 5.

Bảng 5. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh dịch sau bảo quản bằng môi trường thí nghiệm

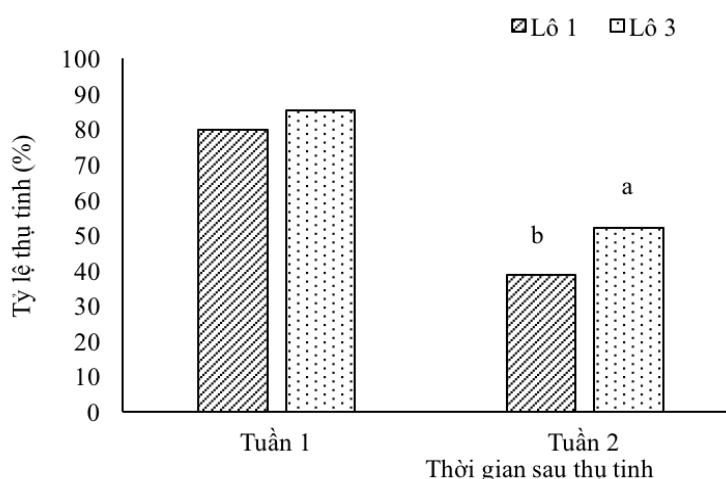
| Thời gian bảo quản | n | Lô thí nghiệm (Mean ± SE) | | | | P Thời gian |
|--------------------|----|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | Lô 1 | Lô 2 | Lô 3 | Lô 4 | |
| 0 giờ | 24 | 10,8 ± 1,02 | 10,7 ± 0,92 | 10,5 ± 0,96 | 11,0 ± 0,96 | |
| 24 giờ | 24 | 17,6 ± 1,22 | 16,9 ± 1,28 | 15,6 ± 0,94 | 17,6 ± 1,11 | <0,0001 |
| 48 giờ | 24 | 21,6 ± 1,55 | 19,9 ± 1,19 | 20,4 ± 1,40 | 22,2 ± 1,12 | |

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một hàng mang chữ cái khác nhau thì sai khác có ý nghĩa thống kê (P<0,05); P_{Thời gian}: Ảnh hưởng của thời gian bảo quản lên chất lượng tinh dịch

Qua Bảng 5 ta thấy, thời gian bảo quản càng kéo dài thì tỷ lệ tinh trùng kỳ hình càng tăng lên (P<0,0001). Tuy nhiên, việc bổ sung vitamin E không có ảnh hưởng rõ rệt lên tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh dịch sau bảo quản (P>0,05).

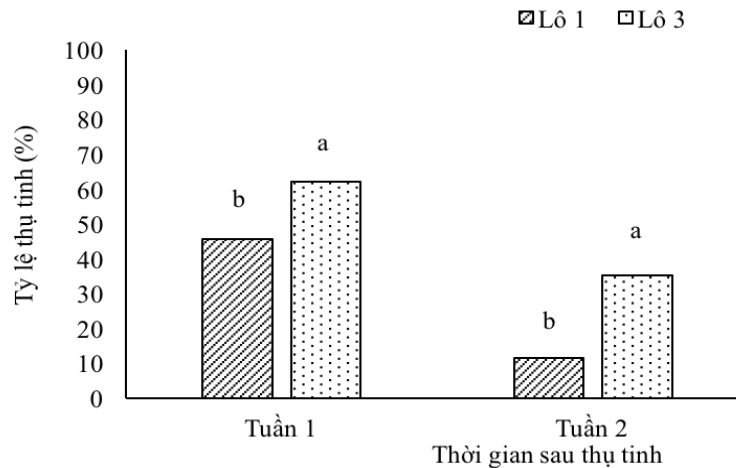
Khả năng thụ tinh của tinh dịch sau bảo quản

Kết quả đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung vitamin E lên chất lượng tinh dịch sau bảo quản cho thấy: chỉ tiêu chất lượng tinh trùng bao gồm hoạt lực (chuyển động sống, tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng), tỷ lệ sống đều đạt cao nhất ở lô sử dụng môi trường có bổ sung vitamin E ở nồng độ 9 µg/mL. Do đó, tinh dịch sau bảo quản 24 và 48 giờ ở Lô 1 và Lô 3 sẽ được tiếp tục đánh giá khả năng thụ tinh. Kết quả đánh giá khả năng thụ tinh của tinh dịch sau bảo quản được thể hiện ở Đồ thị 1 (24 giờ bảo quản) và Đồ thị 2 (48 giờ bảo quản).



Đồ thị 1. Tỷ lệ thụ tinh của tinh dịch sau bảo quản 24 giờ

Qua Đồ thị 1 ta thấy, khi gà mái được thụ tinh bởi tinh dịch sau bảo quản 24 giờ, tỷ lệ thụ tinh đạt cao ở cả 2 Lô 1 và Lô 3 (85,30% và 79,63%) ở tuần thứ nhất sau thụ tinh. Ở tuần này, tỷ lệ thụ tinh ở Lô 3 có cao hơn Lô 1 nhưng sự sai khác chưa rõ ràng ($P>0,05$). Sang tuần thứ 2 tỷ lệ này giảm rõ rệt, chỉ còn 52,15 - 38,75%. Ở tuần thứ 2 sau tỷ lệ thụ tinh ở lô Lô 3 cao hơn Lô 1 ($P<0,05$) điều này cho thấy rõ ảnh hưởng của vitamin E lên tỷ lệ thụ tinh.



Đồ thị 2. Tỷ lệ thụ tinh của tinh dịch sau bảo quản 48 giờ

Đồ thị 2 thể hiện kết quả thụ tinh của tinh dịch sau bảo quản 48 giờ. Kết quả cho thấy tỷ lệ thụ tinh của tinh dịch sau 48 giờ bảo quản ở tuần thứ nhất khá cao từ 45,76-62,15%. Trong đó, tỷ lệ thụ tinh của Lô 3 đạt 62,15%, cao hơn Lô 1 16,39%. Sang tuần thứ 2, ở Lô 1 tỷ lệ thụ tinh chỉ đạt 11,68%, trong khi đó ở Lô 3 tỷ lệ thụ tinh vẫn đạt 35,27%. Sự sai khác giữa hai lô thí nghiệm ở cả tuần 1 và tuần 2 sau thụ tinh là có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$). Như vậy có thể thấy, bổ sung vitamin E vào môi trường bảo quản có tác dụng nâng cao chất lượng tinh dịch bảo quản và kéo dài thời gian bảo quản lên đến 48 giờ.

KẾT LUẬN

Chất lượng tinh dịch gà nhiều cựa Phú Thọ trong thí nghiệm đạt tương đối tốt với trung bình thể tích 0,4ml/lần khai thác, nồng độ tinh trùng đạt 3,85 tỷ tinh trùng/ml, hoạt động khối của tinh dịch đạt 4,15 điểm, tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng và tỷ lệ sống của tinh dịch gà nhiều cựa đạt lần lượt 89,16% và 88,60%, tỷ lệ kỳ hình trung bình là 8,32%.

Bổ sung vitamin E ở nồng độ 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ môi trường bảo quản làm tăng hoạt lực tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng sống và khả năng thụ tinh của tinh dịch sau bảo quản 24 và 48 giờ. Cụ thể, ở thời điểm 24 và 48 giờ sau bảo quản hoạt động khối tăng so với đối chứng lần lượt là 7,5% và 23%, tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng tăng 3,5% và 2,5%, tỷ lệ thụ tinh tăng từ 13,4% đến 23,59%. Tuy nhiên, bổ sung vitamin E không làm giảm tỷ lệ tinh trùng kỳ hình so với lô ĐC trong thời gian bảo quản.

Từ đó có thể thấy, bổ sung vitamin E với nồng độ 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ môi trường bảo quản đã nâng cao chất lượng tinh dịch gà nhiều cựa Phú Thọ bảo quản ở dạng lỏng (4°C). Điều này có ý nghĩa to lớn trong việc nâng cao khả năng sinh sản của giống gà nhiều cựa Phú Thọ, khắc phục tình trạng giao phối tự nhiên kém, tăng đàn nhanh, hiệu quả, góp phần bảo tồn và phát triển giống gà này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

- Nguyễn Tấn Anh. 2003. Thụ tinh nhân tạo cho gia súc-gia cầm. Nhà xuất bản Lao động - Xã hội.
- Đỗ Thị Huế, Đỗ Đức Lực, Ngô Thị Dung, Nguyễn Hoàng Thịnh và Vũ Đình Tôn. 2015. Chất lượng tinh dịch gà Hồ và một số yếu tố ảnh hưởng. Kỷ yếu Hội thảo "Phát triển chăn nuôi bền vững". Học Viện Nông nghiệp Việt Nam, ngày 18-19/12/2015, tr. 1-7.
- Đỗ Thị Huế, Nguyễn Văn Duy, Nguyễn Thị Xuân, Đỗ Đức Lực, Lê Thị Thắm, Đặng Vũ Bình và Vũ Đình Tôn. 2017. Chất lượng tinh dịch và các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng tinh dịch gà Đông Tảo. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 15(5), tr. 589-604.
- Nguyễn Hoài Nam, Nguyễn Thị Mai Thơ, Trịnh Thị Phương Thảo, Nhâm Thuý Quỳnh, Lê Quang Hải, Nông Văn Thượng, Cao Thị Mỹ Hạnh và Nguyễn Thị Nhiên. 2012. Một số chỉ tiêu chất lượng tinh dịch gà Ri khai thác bằng phương pháp mát xa. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 10(3), tr. 433-437.
- Nguyễn Hoàng Thịnh, Phạm Kim Đăng, Vũ Thị Thuý Hằng, Hoàng Anh Tuấn và Bùi Hữu Đoàn. 2016. Một số đặc điểm ngoại hình, khả năng sản xuất của gà nhiều ngón nuôi tại rừng quốc gia Xuân Sơn, huyện Tân Sơn, tỉnh Phú Thọ. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, tập 14, số 1, tr. 9-20.

Tiếng nước ngoài

- Agarwal, A., Saleh, R. A. and Bedaiwy, M. A. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 79, pp. 829-843.
- Aitken, R. J. and Clarkson, J. S. 1988. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology* 9, pp. 367-376.
- Al-Daraji, H. J. 2000. Effect of vitamin E on semen quality and fertilizing ability of roosters. *Dirasat, Agricultural Science*, 27, pp. 360-365.
- Burrows, W. H. and Quinn, J. P. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science* 16, pp. 19-24.
- Cao, G. and Cutler, R. G. 1993. High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 17, pp. 189-201.
- Dalvit, G. C., Cetica, P. D. and Beconi, M. T. 1998. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology* 49, pp. 619-627.
- Donoghue, A. M. and Wishart, G. J. 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science* 62, pp. 213-232.
- Douard, V., Hermier, D. and Blesbois, E. 2000. Changes in turkey semen lipids during liquid in vitro storage. *Biology of Reproduction* 63, pp. 1450-1456.
- Engel, S., Schreiner, T. and Petzoldt, R. 1999. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. *Andrologia* 31, pp. 17-22.
- Halliwel, B. and Chirico, S. 1993. Lipid-peroxidation - Its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition* 57, pp. 715-725.
- Herman, H. A. and Madden, F. W. 1993. *The Artificial Insemination and Embryo Transfer of Dairy and Beef Cattle: A Handbook and Laboratory Manual* (8th Edition). Interstate Printers & Publishers.
- Hu, J. H., Zhao, X. L., Tian, W. Q., Zan, L. S. and Li, Q. W. 2011. Effects of vitamin E supplementation in the extender on frozen-thawed bovine semen preservation. *Animal* 5, pp. 107-112.
- Mortimer, D. 1994. *Practical Laboratory Andrology*. Oxford University Press.
- Niki, E., Yamamoto, Y., Komuro, E. and Sato, K. 1991. Membrane damage due to lipid oxidation. *American Journal of Clinical Nutrition* 53, S201-S205.
- Niu, D. M. and Wang, J. J. 2009. Lipids in the sperm plasma membrane and their role in fertilization. *Zhonghua Nan Ke Xue* 15, pp. 651-655.

- Pagl, R., Aurich, J. and Aurich, C. 2006. Reactive oxygen species and their influence on stallion semen fertility - a review. *Pferdeheilkunde* 22, pp. 212-217.
- Quinn, J. P. and Burrows, W. H. 1936. Artificial insemination in flowls. *Journal of Heredity* 27, pp. 31-38.
- Sharma, R. K. and Agarwal, A. 1996. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology* 48, pp. 835-850.
- Surai, P. F., Fujihara, N., Speake, B. K., Brillard, J. P., Wishart, G. J. and Sparks, N. H. C. 2001. Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 14, pp. 1024-1050.
- Wang, A. W., Zhang, H., Ikemoto, I., Anderson, D. J. and Loughlin, K. R. 1997. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. *Urology* 49, pp. 921-925.

ABSTRACT

The effects of vitamin E supplementation on Phu Tho multi-spur chicken semen quality during liquid storage

The current study investigated the effects of vitamin E supplementation on chicken semen up to 48 h in liquid storage. Pooled semen was divided into control and treatment groups with the adding of different concentration of vitamin E. The motility (mass activity, progressive motility), viability and abnormality of sperm were tested at 0 h, 24 h, and 48 h of storage. The results of the experiment showed that the motility of stored sperm was increased by the addition of 9 µg of vitamin E per mL extender after 24 h (7.5% mass activity and 11.28% progressive motility) and 48 h (23% mass activity and 28.32% progressive motility). The viability of sperm also was improved by adding vitamin E at the same concentration after 24 h (significantly) and 48 h (tendency) of storage (3.5% and 2.5% higher than viability). However, there was no significant difference in the abnormality of sperm between the control and treatment groups. After storage 24 h, the fertility of stored sperm was not different between the control and treatment groups in the first week after insemination. In the second week, the fertility of semen was highest by the addition of 9 µg/mL vitamin E ($P < 0.05$). Until 48 h of storage, the fertility was higher in the treatment group with 9 µg/mL vitamin E addition (62.15% in 1st week after insemination and 45.76% in 2nd week after insemination) compared to control group (35.27% and 11.68%, respectively). In conclusion, the addition of vitamin E to extender improved the motility, viability, and fertility of chicken sperm during liquid preservation and the optimum concentration was 9 µg per mL extender.

Keywords: *Phu Tho multispur chicken, semen, liquid storage, vitamin E, antioxidant*

Ngày nhận bài: 10/2/2020

Ngày phản biện đánh giá: 18/2/2020

Ngày chấp nhận đăng: 29/4/2020

Người phản biện: *GS.TS. Nguyễn Văn Thanh*