

NGHIÊN CỨU ĐÔNG LẠNH NHANH TINH DỊCH CHÓ PHÚ QUỐC

*Trần Thị Chi, Vũ Hải Yến,
Nguyễn Tuấn Dũng, Nguyễn Văn Thanh
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

TÓM TẮT

Nghiên cứu thử nghiệm đông lạnh nhanh tinh dịch chó Phú Quốc đã được thực hiện nhằm phục vụ việc bảo tồn và nhân giống giống chó này bằng kỹ thuật phối tinh nhân tạo. (i) Chất lượng tinh của 6 con chó đực giống Phú Quốc được đánh giá, tinh được khai thác 6 lần/đực giống, 5 ngày lấy tinh một lần. Kết quả nghiên cứu cho thấy thể tích tinh dịch phân đoạn giàu tinh trùng là $1,42 \pm 0,13$ ml; hoạt lực tinh trùng đạt $0,86 \pm 0,05$ điểm; nồng độ tinh trùng đạt $604,7 \pm 85,0$ triệu tinh trùng/ml, tổng số tinh trùng tiến thẳng/lần khai thác đạt $496,9 \pm 38,9$ triệu tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình là $11,1 \pm 0,9\%$. (ii) Đông lạnh nhanh các mẫu tinh đã được thực hiện theo quy trình CERCA (Benechet, 2007) trong môi trường TCG (Tris-Citrate-Glucose) có bổ sung 20% lòng đỏ trứng gà và thử nghiệm bổ sung chất chống choáng lạnh là glycerol (với các mức hàm lượng thử nghiệm là 0; 4; 6 và 8% thể tích) hoặc ethylene glycol (với các mức hàm lượng thử nghiệm là 0; 6; 8 và 10% thể tích); tinh được đóng trong cọng rạ 0,25 ml chứa 100 triệu tinh trùng/liều tinh; sau 2 ngày bảo quản trong nitơ lỏng, các mẫu tinh được rã đông ở 37°C trong 1 phút. Kết quả xác định chất lượng tinh cho thấy hoạt lực tinh trùng sau rã đông đạt cao nhất trong môi trường chứa 6% glycerol và 8% ethylene glycol, đạt tương ứng là $0,46 \pm 0,02$ và $0,49 \pm 0,03$ điểm; tỷ lệ tinh trùng kỳ hình tương ứng là $24,61 \pm 0,39\%$ và $22,86 \pm 0,33\%$.

Từ khóa: Chó Phú Quốc, tinh trùng, tinh dịch, bảo quản đông lạnh, chất bảo vệ đông lạnh, chất lượng tinh trùng.

A research on cryopreservation of Phu Quoc dog semen

*Tran Thi Chi, Vu Hai Yen,
Nguyen Tuan Dung, Nguyen Van Thanh*

SUMMARY

Study on Cryopreservation for Phu Quoc dog semen was conducted in order to serve for the conservation and propagation of this breed by artificial insemination. (i) The quality of sperm of 6 Phu Quoc dogs was evaluated. The semens were harvested in 6 times per sire, the interval between each harvesting time was 5 days. The studied results showed that the volume of semen containing highest number of sperms was 1.42 ± 0.13 ml, sperm activity reached 0.86 ± 0.05 points, sperm concentration was 604.7 ± 85.0 million sperms per 1 ml semen, of which the total number of sperms moving directly per each harvesting time reached 496.9 ± 38.9 million spermatozoa and the sperm abnormality rate was $11.1 \pm 0.9\%$. The semen samples were packed in straws with 0.25 ml containing a total of 100 million sperm per dose and conserved in liquid nitrogen according to the CERCA procedure (Benechet, 2007) in TCG (Tris-Citrate-Glucose) medium supplemented 20% of egg yolk, with cryo-protectants, such as: glycerol (at the test levels: 0, 4, 6 and 8% by volume) or ethylene glycol (at the test levels: 0, 6, 8 and 10% by volume). After 2 days of conservation in liquid nitrogen, the semen samples were thawed at 37°C for 1 minute. The result of testing sperm quality showed that the activity of sperm after thawing reached the highest level in the medium containing 6% glycerol or 8% ethylene glycol, that was 0.46 ± 0.02 and 49 ± 0.03 points, respectively, and the sperm abnormality rate was $24.61 \pm 0.39\%$ and $22.86 \pm 0.33\%$, respectively.

Keywords: Phu Quoc dogs, sperm, semen, cryopreservation, cryoprotectants, sperm quality.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Truyền tinh nhân tạo là một trong những kỹ thuật hỗ trợ sinh sản đầu tiên ở nhiều loài động vật. Kể từ thành công đầu tiên được thực hiện bởi Harp và cs. (1954), cho đến nay kỹ thuật truyền tinh nhân tạo trên chó được áp dụng ngày càng phổ biến trên thế giới và ở Việt Nam. Kỹ thuật này đem lại nhiều lợi ích cho các nhà chọn giống và nhân giống chó: giảm phiền phức và chi phí do phải vận chuyển chó, hạn chế lây lan bệnh truyền nhiễm, có thể bảo quản tinh lâu dài, hiệu quả kinh tế cao... Bên cạnh đó, thành công của công nghệ đông lạnh tinh trùng trở thành công cụ đắc lực cho kỹ thuật phối tinh nhân tạo chó trong nhân giống và bảo tồn các giống chó bản địa. Năm 1949, với công bố đầu tiên của Polge và cs. về chất glycerol và công bố của Lovelock và Bishop năm 1959 về chất dimethyl sulfoxide với vai trò chất bảo vệ tế bào động vật trong đông lạnh, nhiều nghiên cứu về đông lạnh tinh trùng đã được tiến hành và áp dụng thành công trong nhân giống chó (Thomas và cs., 1993, Linde-Forsberg C. và cs., 1995, Nöthling và cs., 2005, Martins-Bessa và cs., 2006, Manuela Stănescu và cs., 2012). Bên cạnh việc phát hiện và công bố khoảng hơn 400 giống chó khác nhau trên thế giới, trong đó có 50 giống phổ biến, chiếm 90% tổng số cá thể chó, thì ở Việt Nam, đã du nhập và nhân thuần nhiều giống chó trên thế giới cùng với 4 giống chó bản địa quý của Việt Nam hay còn gọi là “Tứ đại quốc khuyển” gồm giống chó H'Mông (dòng cộc đuôi và có đuôi), giống chó Bắc Hà, giống chó Phú Quốc và giống chó hiếm gặp Dingo. Chó Phú Quốc của Việt Nam là một trong 3 giống chó trên thế giới có đặc tính có xoáy lưng bên cạnh giống chó xoáy lưng Thái Lan và chó xoáy lưng châu Phi. Chó Phú Quốc được Hiệp hội những người nuôi chó giống Việt Nam VKA, thành viên của Hiệp hội những người nuôi chó giống quốc tế FCI công nhận và công bố bản tiêu chuẩn chó bản địa đối với giống chó này và giống chó H'Mông cộc đuôi năm 2009. Ở Việt Nam, đã có một số công bố về nghiên cứu bảo quản tinh chó ở dạng lỏng

ở nhiệt độ 5°C và bảo quản tinh đông lạnh đối với một số giống chó nghiệp vụ (Đỗ Văn Thu và cs., 2008), tuy nhiên, rất ít những công bố về kỹ thuật đông lạnh tinh chó Phú Quốc phục vụ nhân giống và bảo tồn nguồn gen giống chó này.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Các mẫu tinh trùng được sử dụng cho thí nghiệm được khai thác từ 6 chó đực giống Phú Quốc nuôi tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam. Cả 6 cá thể chó đực giống Phú Quốc thí nghiệm đều là giống thuần chủng được cấp giấy chứng nhận giống gốc của Hiệp hội những người nuôi chó giống Việt Nam VKA. Các chó đực giống trong độ tuổi sinh sản (từ 18 đến 24 tháng tuổi), được cho ăn và chăm sóc cùng một chế độ riêng cho chó đực giống, được tiêm chủng vaccine phòng bệnh và đạt trạng thái sức khỏe tốt. Các chó đực giống được huấn luyện và khai thác tinh nhân tạo bởi cùng một kỹ thuật viên, tần suất khai thác tinh là 5 ngày một lần.

Tinh chó được khai thác bằng phương pháp massage theo Rita Payan-Carreira (2011), phân đoạn tinh giai đoạn 1 không thu nhận, phân đoạn giàu tinh được thu nhận và bảo quản trong cốc thủy tinh được giữ ấm ở 34°C. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 6 lần, tương ứng với 6 lần khai thác tinh của mỗi chó đực.

2.2. Xác định các chỉ tiêu chất lượng tinh dịch chó

Các chỉ tiêu đánh giá chất lượng tinh dịch chó gồm thể tích tinh dịch phân đoạn giàu tinh, hoạt lực tinh trùng, nồng độ tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình được thực hiện theo mô tả của Rita Payan-Carreira (2011): Thể tích tinh dịch được xác định bằng ống nghiệm chia vạch; Hoạt lực của tinh trùng được xác định bằng cách nhỏ 3 giọt tinh lên lam kính, quan sát trên kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 160 lần, ước lượng và đánh giá điểm hoạt lực của mẫu tinh sau khi quan sát từ 3 giọt tinh, thang điểm đánh giá hoạt

lực từ 0,1 đến 1; Nồng độ tinh trùng được xác định bằng sử dụng buồng đếm Neubauer với độ pha loãng tinh 1:200 trong dung dịch NaCl 10%; Tinh trùng kỳ hình được xác định sau khi ủ trong dung dịch formol citrate 4% và quan sát dưới kính hiển vi ở độ phóng đại 1000 lần, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình được xác định trên tổng số 500 tinh trùng được quan sát/mẫu.

2.3. Đông lạnh nhanh và rã đông tinh chó

Tinh chó được đông lạnh theo quy trình CERCA được mô tả bởi Benechet năm 2007: những mẫu tinh có nồng độ tinh trùng trên 300 triệu tinh trùng/ml, hoạt lực tinh trên 0,7 điểm, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình dưới 20% đạt yêu cầu để đông lạnh tinh. Tinh trùng được ly tâm 2000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ 25°C để loại bỏ tinh thanh. Tinh trùng được pha trong môi trường TCG (Tris-Citrate-Glucose) bổ sung 20% lòng đỏ trứng gà, ủ cân bằng ở 4°C trong 1 giờ. Sau đó, tinh trùng được pha loãng lần 2 trong môi trường TCG bổ sung 20% lòng đỏ trứng gà và hàm lượng khác nhau của glycerol hoặc ethylene glycol để đạt hàm lượng 0, 4, 6 và 8% thể tích với glycerol và 0, 6, 8, 10% thể tích với ethylene glycol và đóng cọng rạ 0,25 ml với tổng số 100 triệu tinh trùng/cọng rạ. Cọng rạ được ủ 2 giờ ở 4°C trước khi được hơ trên hơi nitơ (cách mặt nitơ lỏng 4 cm) trong 20 phút rồi bảo quản trong nitơ lỏng -196°C.

Sau 2 ngày bảo quản trong nitơ lỏng, các cọng rạ được rã đông ở 37°C trong 45 giây, đánh giá hoạt lực tinh trùng và xác định tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau giải đông.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chất lượng tinh nguyên của chó Phú Quốc

Khả năng sinh sản của một giống loài đối với cá thể đực giống được thể hiện qua các đặc tính sản xuất tinh dịch và tinh trùng và các đặc tính này chịu ảnh hưởng của nhiều nhân tố, trong đó có giống, mùa vụ, tuổi đực giống... (Rita Payan và cs., 2011). Chất lượng tinh dịch cũng là nhân

tố quyết định đến chất lượng tinh bảo quản theo các phương pháp khác nhau, trong đó có kỹ thuật đông lạnh tinh trùng (Harp và cs., 1954; Linde-Forsberg, 1995; Rita Payan và cs., 2011; Manuela Stănescu và cs., 2012). Đánh giá chất lượng tinh dịch của tinh nguyên là công việc nhằm chọn nguyên liệu đầu vào cho thí nghiệm đông lạnh tinh chó: nồng độ tinh trùng trên 300 triệu tinh trùng/ml, hoạt lực tinh trên 0,7 điểm, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình dưới 20% để đạt yêu cầu để đông lạnh tinh (Rita Payan và cs., 2011; Manuela Stănescu và cs., 2012).

Kết quả xác định các chỉ tiêu chất lượng tinh dịch của 6 cá thể chó đực giống Phú Quốc thí nghiệm (lặp lại 6 lần khai thác/đực giống) được trình bày trong bảng 1.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, lượng tinh dịch trung bình thu nhận từ giai đoạn 2 (giai đoạn giàu tinh) của quá trình phóng tinh của 6 chó đực giống Phú Quốc nghiên cứu là $1,42 \pm 0,13$ ml, cụ thể đối với các đực giống Phú Quốc lần lượt là: $1,30 \pm 0,09$, $1,45 \pm 0,15$, $1,43 \pm 0,08$, $1,50 \pm 0,09$, $1,47 \pm 0,19$, $1,35 \pm 0,10$. Trong nghiên cứu này, kết quả chỉ tiêu tinh trùng vận động tiến thẳng trung bình trên chó đực giống là rất tốt. Hoạt lực tinh nguyên trên trung bình của các đực giống Phú Quốc thí nghiệm đạt $0,86 \pm 0,05$ điểm, cụ thể với chó đực giống Phú Quốc 1 là $0,85 \pm 0,05$ điểm, trên chó đực giống Phú Quốc 2 là $0,88 \pm 0,04$ điểm và trên chó đực giống Phú Quốc 3 là $0,83 \pm 0,05$ điểm, trên đực giống Phú Quốc 4 là $0,87 \pm 0,05$, trên đực giống Phú Quốc 5 là $0,88 \pm 0,04$ và $1,35 \pm 0,10$ đối với đực giống Phú Quốc 6. Khi so sánh chỉ tiêu này giữa các cá thể chó đực giống, có thể thấy có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Với cùng một điều kiện chăm sóc và nuôi dưỡng, sự sai khác về chỉ tiêu nồng độ tinh trùng giữa các cá thể đực giống có nguyên nhân từ yếu tố di truyền đặc trưng cho từng cá thể và “cơ địa” của từng cá thể. Theo kết quả được trình bày trong bảng 1, ta thấy kết quả trung bình về nồng độ tinh trùng đối với 6 chó đực giống trong nghiên cứu này là $604,7 \pm 85,0$ triệu tinh trùng/ml, ở các đực giống Phú Quốc lần lượt là $541,0 \pm 80,7$; $642,0 \pm 74,3$; $569,5 \pm 35,9$;

Bảng 1. Chất lượng tinh nguyên chó Phú Quốc theo mùa

Chỉ tiêu	Đực 1	Đực 2	Đực 3	Đực 4	Đực 5	Đực 6	Trung bình
	Mean ±SD	Mean ±SD	Mean ±SD	Mean ±SD	Mean ±SD	Mean ±SD	Mean ±SD
Lượng xuất tinh (V, ml)	1,30 ±0,09 ^a	1,45 ±0,15 ^b	1,43 ±0,08 ^b	1,50 ±0,09 ^c	1,47 ±0,19 ^{bc}	1,35 ±0,10 ^a	1,42 ± 0,13
Hoạt lực tinh trùng (A, %)	0,85 ±0,05 ^a	0,88 ±0,04 ^a	0,83 ±0,05 ^a	0,87 ±0,05 ^a	0,88 ±0,04 ^a	0,83 ±0,05 ^a	0,86 ±0,05
Nồng độ tinh trùng (C, tỷ/ml)	456,7 ±22,8 ^a	501,3 ±13,0 ^a	477,7 ±16,3 ^a	521,0 ±9,2 ^b	442,7 ±27,2 ^c	552,0 ±24,2 ^d	496,9 ±38,9
Tổng số tinh trùng tiến thẳng/lần khai thác (VAC, tỷ)	541,0 ±80,7 ^{ac}	642,0 ±74,3 ^b	569,5 ±35,9 ^a	678,6 ±73,3 ^{cd}	574,9 ±97,0 ^a	622,0 ±80,5 ^{ad}	604,7 ±85,0
Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	10,7 ±0,5 ^a	11,4 ±0,5 ^b	10,0 ±0,6 ^a	12,2 ±0,7 ^b	10,7 ±0,4 ^a	11,5 ±0,4 ^b	11,1 ±0,9

Ghi chú: Trên cùng một hàng, các giá trị có chữ cái bên trên khác nhau thể hiện sự giống nhau không có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

678,6±73,3; 574,9±97,0; và 622,0±80,5. Như vậy nồng độ tinh trùng của cá thể chó đực giống Phú Quốc 6 là cao nhất và của cá thể chó Phú Quốc 5 là thấp nhất ($P < 0,05$). Theo Đỗ Văn Thu (2008), nồng độ tinh trùng của đực giống Berger, Labrador và Cocker nuôi tại Việt Nam đạt khoảng 300 triệu tinh trùng/ml, ít hơn so với các cá thể đực giống Phú Quốc trong nghiên cứu này. Tuy nhiên, với thể tích tinh nhiều vượt trội của các đực giống trong nghiên cứu này cho thấy khả năng sinh tinh rất tốt của chúng so với các giống chó khác nuôi tại Việt Nam. Tinh trùng kỳ hình là tinh trùng có hình thái không

bình thường ở đầu, cổ, thân, đuôi. Chúng không có khả năng thụ tinh. Đây là chỉ tiêu quan trọng đánh giá chất lượng tinh tại thời điểm kiểm tra chất lượng tinh trùng. Nếu tỷ lệ tinh trùng kỳ hình quá nhiều, tỷ lệ tinh trùng có khả năng thụ tinh thấp thì liệu tinh đó sẽ bị loại bỏ. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình giữa các giống chó đực trình bày tại bảng 1. Kết quả cho thấy tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của các chó đực giống đạt tương đương nhau, đều ở mức thấp hơn 20%, đạt điều kiện để đông lạnh tinh.

3.2. Đông lạnh nhanh tinh chó Phú Quốc trong môi trường chứa glycerol

Bảng 2. Kết quả đánh giá chất lượng tinh sau giải đông vào mùa nóng

Môi trường bảo quản	Chỉ tiêu chất lượng tinh sau giải đông	
	Hoạt lực tinh trùng (điểm)	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)
TCG + 20% EY + 0% Glycerol	0,08±0,01 ^a	73,45±0,51 ^a
TCG + 20% EY + 4% Glycerol	0,28±0,02 ^b	29,33±0,32 ^b
TCG + 20% EY + 6% Glycerol	0,46±0,02 ^c	24,61±0,39 ^c
TCG + 20% EY + 8% Glycerol	0,35±0,02 ^d	27,86±0,39 ^d

Ghi chú: Trên cùng một hàng, các giá trị có chữ cái bên trên khác nhau thể hiện sự giống nhau không có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

Kết quả cho thấy: Các mẫu tinh được đông lạnh trong môi trường không chứa chất chống choáng lạnh (môi trường đối chứng), các chỉ tiêu chất lượng tinh sau rã đông đều chỉ ở mức thấp: hoạt lực tinh trùng của các mẫu tinh đối chứng được rã đông ở nhiệt độ ở 37°C ở mốc thời gian sau 2 ngày đông lạnh đạt $0,08 \pm 0,01$ điểm. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình cao, đạt trên 70%, với kết quả này cho thấy rõ ràng nếu trong môi trường đông lạnh không có chất chống choáng lạnh, hiệu quả đông lạnh tinh rất thấp, điều này rất phù hợp với cơ sở lý thuyết cũng như kết quả đông lạnh thực tế không chỉ ở tinh chó mà tương tự đối với các loại tinh khác. Nguyên nhân là do khi không có chất chống choáng lạnh, màng tinh trùng không được bảo vệ khỏi quá trình nước đi ra, đi vào trong các bước hạ nhiệt nhanh xuống nhiệt độ âm và bước giải đông khi mà tinh được nhanh chóng nâng nhiệt độ từ đông đá lên nhiệt độ ấm, dẫn đến sự thay đổi đột ngột áp lực thẩm thấu giữa hai phía của màng tế bào, gây mất khả năng vận động của tế bào, tăng tỷ lệ chết của tế bào và làm thay đổi hình dạng của tế bào sau giải đông. Về chỉ tiêu hoạt lực tinh trùng (điểm) của các mẫu tinh được đông lạnh

trong môi trường có bổ sung glycerol ở các mức hàm lượng khác nhau, các mẫu tinh rã đông sau 2 ngày bảo quản đông lạnh trong nitơ lỏng: kết quả sau rã đông cho thấy, với các mẫu tinh đông lạnh trong môi trường có 6% hàm lượng glycerol có hoạt lực tinh trùng sau rã đông cao hơn so với các mẫu tinh đông lạnh trong môi trường bổ sung 4% và 8% hàm lượng glycerol. Cụ thể là: hoạt lực của mẫu tinh đông lạnh trong môi trường chứa 6% glycerol rã đông ở 37°C đạt tương ứng là $0,46 \pm 0,02$ điểm, cao hơn so với các mẫu đông lạnh trong môi trường chứa 4% và 8% glycerol đạt tương ứng ở nhiệt độ rã đông 37°C là $0,28 \pm 0,02$ điểm và $0,35 \pm 0,02$ điểm. Hoạt lực tinh trùng sau giải đông cao hơn khi so sánh với các mẫu tinh đông lạnh trong môi trường không chứa glycerol ở cùng một nhiệt độ rã đông 37°C.

3.3. Đông lạnh nhanh tinh chó Phú Quốc trong môi trường chứa ethylen glycol

Kết quả đánh giá hiệu quả bảo quản tinh đông lạnh trong môi trường chứa ethylene glycol được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá chất lượng tinh sau giải đông vào mùa lạnh

Môi trường bảo quản	Chỉ tiêu chất lượng tinh sau giải đông	
	Hoạt lực tinh trùng (điểm)	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)
TCG + 20% EY + 0% ethylen glycol	$0,04 \pm 0,01^a$	$74,96 \pm 0,46^a$
TCG + 20% EY + 6% ethylen glycol	$0,32 \pm 0,02^b$	$27,72 \pm 0,38^b$
TCG + 20% EY + 8% ethylen glycol	$0,49 \pm 0,01^c$	$22,86 \pm 0,34^c$
TCG + 20% EY + 10% ethylen elycol	$0,39 \pm 0,02^d$	$28,08 \pm 0,31^b$

Ghi chú: Trên cùng một hàng, các giá trị có chữ cái bên trên khác nhau thể hiện sự giống nhau không có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

Như vậy, kết quả so sánh thống kê với mức ý nghĩa $p < 0,05$ cho thấy các mẫu tinh được đông lạnh trong môi trường không chứa chất chống choáng lạnh (môi trường đối chứng), các chỉ tiêu chất lượng tinh sau rã đông đều chỉ ở mức thấp: hoạt lực tinh trùng của các mẫu tinh đối

chứng được rã đông ở nhiệt độ ở 37°C ở mốc thời gian sau 2 ngày đông lạnh đạt $0,04 \pm 0,01$ điểm; tỷ lệ tinh trùng kỳ hình cao đạt trên 70%. Với kết quả này cho thấy rõ ràng nếu trong môi trường đông lạnh không có chất chống choáng lạnh, hiệu quả đông lạnh tinh rất thấp, điều này

rất phù hợp với cơ sở lý thuyết cũng như kết quả đông lạnh thực tế không chỉ ở tinh chó mà tương tự đối với các loại tinh khác. Nguyên nhân là do khi không có chất chống choáng lạnh, màng tinh trùng không được bảo vệ khỏi quá trình nước đi ra, đi vào trong các bước hạ nhiệt nhanh xuống nhiệt độ âm và bước giải đông khi mà tinh được nhanh chóng nâng nhiệt độ từ đông đá lên nhiệt độ ấm, dẫn đến sự thay đổi đột ngột áp lực thẩm thấu giữa hai phía của màng tế bào, gây mất khả năng vận động của tế bào, tăng tỷ lệ chết và làm thay đổi hình dạng của tế bào sau rã đông. Về chỉ tiêu hoạt lực tinh trùng (điểm) của các mẫu tinh được đông lạnh trong môi trường có bổ sung ethylene glycol ở các mức hàm lượng khác nhau, các mẫu tinh rã đông sau 2 ngày bảo quản đông lạnh trong nitơ lỏng: kết quả sau giải

đông cho thấy, với các mẫu tinh đông lạnh trong môi trường có 8% hàm lượng ethylene glycol, có hoạt lực tinh trùng sau rã đông cao hơn so với các mẫu tinh đông lạnh trong môi trường bổ sung 6% và 10% hàm lượng ethylene glycol. Cụ thể là: hoạt lực của mẫu tinh đông lạnh trong môi trường chứa 8% ethylene glycol rã đông ở 37°C đạt tương ứng là $0,49 \pm 0,01$ điểm, cao hơn so với các mẫu đông lạnh trong môi trường chứa 6% và 10% ethylene glycol, đạt tương ứng ở nhiệt độ rã đông 37°C là $0,32 \pm 0,02$ điểm và $0,39 \pm 0,02$ điểm. Hoạt lực tinh trùng sau rã đông cao hơn so với khi so sánh với các mẫu tinh đông lạnh trong môi trường không chứa ethylene glycol ở cùng một nhiệt độ rã đông 37°C.

3.4. So sánh hiệu quả đông lạnh tinh trong môi trường chứa glycerol và ethylene glycol

Bảng 4. Hiệu quả đông lạnh tinh trong môi trường chứa glycerol và ethylene glycol

Môi trường bảo quản	Chỉ tiêu chất lượng tinh sau giải đông	
	Hoạt lực tinh trùng (điểm)	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)
TCG + 20% EY	$0,06 \pm 0,01^a$	$74,20 \pm 0,48^a$
TCG + 20% EY + 6% glycerol	$0,46 \pm 0,02^c$	$24,61 \pm 0,39^c$
TCG + 20% EY + 8% ethylene glycol	$0,49 \pm 0,01^c$	$22,86 \pm 0,34^c$

Ghi chú: Trên cùng một hàng, các giá trị có chữ cái bên trên khác nhau thể hiện sự giống nhau không có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$

Từ bảng 4 cho thấy tinh đông lạnh trong môi trường chứa 8% ethylene glycol có hoạt lực tinh trùng là $0,49 \pm 0,01$, cao hơn so với môi trường đối chứng và môi trường có chứa 6% glycerol lần lượt là $0,06 \pm 0,01$ và $0,46 \pm 0,02$. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh đông lạnh trong môi trường đối chứng là cao nhất $74,20 \pm 0,48\%$, và tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh đông lạnh trong môi trường có chứa 8% ethylene glycol là thấp nhất $22,86 \pm 0,34\%$; còn tinh đông lạnh trong môi trường có chứa 6% glycerol có tỷ lệ tinh trùng kỳ hình là $24,61 \pm 0,39\%$.

IV. KẾT LUẬN

Kết quả xác định chất lượng tinh cho thấy hoạt lực tinh trùng sau rã đông đạt cao nhất trong môi trường chứa 6% glycerol và 8% ethylene glycol.

Kết quả cho thấy môi trường có chứa 8% ethylene glycol là môi trường đông lạnh tinh chó Phú Quốc tốt hơn môi trường có chứa 6% glycerol.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Benechet, N. (2007), Artificial insemination with frozen semen in the dog: analysis of

- records of dogs followed in the Center for Reproduction of Carnivorous at the National Veterinary School of Alfort (CERCA) from January 2001 to December 2006. PhD thesis, Alfort, France.
2. Harp, AE. (1954), Artificial insemination of bitch with preserved semen. *Vet. Rec.* 110: 194–196.
 3. Polge C., Smith A. U., Parkers A. S. (1949), Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures, *Nature*. 164 (4172), 666.
 4. Lovelock J.E., Bishop M. (1959), Prevention of freezing injury to cells by dimethyl sulfoxide. *Nature* 183, 1394-1395.
 5. Linde-Forsberg C. (1995), Artificial insemination with fresh, chilled-extended and frozen-thawed semen in the dog, *Sem. Vet. Med. Surg.*, 10, 48-58.
 6. Nöthling J.O., Shuttleworth R., de Haas K., Thompson P.N. (2005), Homologous prostatic fluid added to frozen-thawed dog spermatozoa prior to intravaginal insemination of bitches resulted in better fertility than albumin-free TALP. *Theriogenology*, 64, 975- 991.
 7. Thomas P.G.A., Larson R.E., Burns J.M., Hahn C.N. (1993), A comparison of three packaging techniques using two extenders for the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 40, 1199-1205.
 8. Martins-Bessa A., Rocha A., Mayenco-Aguirre A. (2006), Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology*. Epub 66(9):2047-55.
 9. Rita Payan, Miranda Sónia, Nizański Wojciech (2011), Artificial Insemination in dog. Intech Europe. ISBN 978-953-307-312-5.
 10. Manuela Stănescu, Alin Ion Bîrtoiu (2012), Freezing of dog's sperm: a review, *Romanian Biotechnological Letters* Vol. 17, No.5, 2012.
 11. Rita Payan-Carreira, Sonia Miranda and Wojciech Nizanski (2011), Artificial Insemination in Dogs, InTech ISBN 978-953-307-312-5
 12. Đỗ Văn Thu, Nguyễn Anh, Nguyễn Tấn Anh (2008). Nghiên cứu môi trường pha loãng tinh dịch chó bảo tồn ở 5°C. *Tạp chí Sinh học* 30 (1):87-93, tháng 03/2008.
 13. Đỗ Văn Thu, Nguyễn Anh, Nguyễn Tấn Anh (2008). Nghiên cứu ảnh hưởng của một số loại đường lên phẩm chất tinh dịch chó trong quá trình đông lạnh. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, tập 46, số 3, 2008, trang 31-38.
 14. Hiệp hội những người nuôi chó giống Việt Nam (2009), Quyết định công nhận tiêu chuẩn giống chó, VKA Số:36/ QĐ-CT.
 15. Hiệp hội những người nuôi chó giống Việt Nam (2009), Bản tiêu chuẩn giống chó Phú Quốc, Bản tiêu chuẩn số 001/VN/20.09.2009 của VKA.
 16. Đỗ Văn Thu và cộng sự (2001). Nghiên cứu một số chỉ tiêu sinh học và bảo tồn tinh dịch chó Berger. Đề tài nghiên cứu khoa học thuộc Trung tâm Huấn luyện chó nghiệp vụ - Bộ Công an.
 17. Đỗ Văn Thu, Nguyễn Anh (2008). Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học tinh dịch chó nghiệp vụ phục vụ cho công tác bảo tồn và thụ tinh nhân tạo, *Tạp chí Sinh học* 30(3): 169-175.
- Ngày nhận 2-3-2018
 Ngày phản biện 22-4-2019
 Ngày đăng 1-6-2019

NGHIÊN CỨU BỔ SUNG BỘT SỮA GẦY VÀ VITAMIN C TRONG MÔI TRƯỜNG BẢO QUẢN DẠNG LỎNG TINH DỊCH CHÓ PHÚ QUỐC

*Ngô Thành Trung¹, Trần Thị Chi²,
Vũ Hải Yên², Vũ Thị Loan², Nguyễn Văn Thanh¹*

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành với mục tiêu xác định hàm lượng bột sữa gầy và vitamin C thích hợp bổ sung trong môi trường bảo quản dạng lỏng tinh dịch chó Phú Quốc. Loại môi trường bảo quản tinh chó được sử dụng là TCF. Các mức hàm lượng thử nghiệm của bột sữa gầy và vitamin C lần lượt là 0; 15; 30; 60 mg/ml và 0; 10; 20; 30 mg/ml. Nhiệt độ bảo quản tinh là 5°C, bội số pha loãng tinh là 1:5. Hoạt lực tinh trùng và tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh bảo quản được đánh giá vào ngày thứ 1, 2 và 3. Tinh của 3 chó đực giống Phú Quốc ở độ tuổi từ 15 đến 24 tháng được khai thác 5 ngày một lần, lặp lại 6 lần cho mỗi thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, môi trường TCF+30 mg/ml bột sữa gầy và môi trường TCF+20 mg/ml vitamin C cho hiệu quả bảo quản tinh chó tốt hơn với hoạt lực tinh trùng trung bình vào ngày thứ 3 bảo quản đạt tương ứng $0,52 \pm 0,06$ và $0,65 \pm 0,07$ điểm; tỷ lệ tinh trùng kỳ hình trung bình tương ứng là $33,2 \pm 0,68\%$ và $17,9 \pm 0,37\%$. Khi bổ sung đồng thời bột sữa gầy và vitamin C với hàm lượng tương ứng là 15 mg/ml và 20 mg/ml trong môi trường TCF cho hiệu quả bảo quản tinh tốt hơn ($0,70 \pm 0,05$ điểm hoạt lực tinh trùng và $14,9 \pm 0,63\%$ tỷ lệ tinh trùng kỳ hình vào ngày thứ 3 bảo quản).

Từ khóa: Chó Phú Quốc, tinh dịch, bảo quản tinh dịch dạng lỏng, bột sữa gầy, vitamin C.

Research on adding skim milk powder and vitamin C in liquid preservation extender for Phu Quoc dog semen

*Ngo Thanh Trung, Tran Thi Chi,
Vu Hai Yen, Vu Thi Loan, Nguyen Van Thanh*

SUMMARY

The study was conducted to access the suitable levels of skim milk powder and vitamin C adding in liquid preservation extender for Phu Quoc dog semen. This liquid preservation extender name was TCF. The test levels of skim milk powder and vitamin C supplementing in TCF were 0; 15; 30, 60 mg/ml and 0; 10; 20; 30 mg/ml, respectively. The preservation temperature for semen was 5°C, the rate of semen dilution was 1:5. The sperm motility and abnormality were evaluated on the 1st, 2nd and 3rd day after preservation. The semen samples were collected from 3 Phu Quoc male dogs at 15 to 24 months of age, every 5 days for each collecting time, in a total of 6 collecting times. The studied results showed that, the semen samples preserved in TCF extender + 30 mg/ml skim milk powder and TCF extender + 20 mg/ml vitamin C have given better preservation effectiveness with the average sperm motility values in the day 3rd reached 0.52 ± 0.06 and 0.65 ± 0.07 points, respectively and with the average sperm abnormality rate was 33.2 ± 0.68 and $17.9 \pm 0.37\%$, respectively. Adding simultaneously skim milk powder (with 15mg/1ml) and vitamin C (with 20mg/1ml) in TCF extender has given better preservation effectiveness (0.70 ± 0.05 points of sperm motility values and $14.9 \pm 0.63\%$ of sperm abnormality rate in the day 3rd of preservation).

Keywords: Phu Quoc dogs, semen, liquid preservation extender, skim milk powder, vitamin C.

¹ Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

² Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam