

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔI TRƯỜNG PHA LOÃNG BỔ SUNG LÒNG ĐỎ TRỨNG GÀ VÀ CAFFEINE ĐẾN CHẤT LƯỢNG TINH DÊ

**Ngô Thành Trung^{*}, Trần Thị Chi, Vũ Hải Yến, Nguyễn Tuấn Dũng,
Trịnh Thị Linh Chi, Sử Thanh Long**

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

**Tác giả liên hệ: nttrungcnsh@vnua.edu.vn*

Ngày nhận bài: 25.05.2020

Ngày chấp nhận đăng: 12.09.2020

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là xác định được ảnh hưởng của việc bổ sung các thành phần lòng đỏ trứng gà và caffeine trong môi trường TCG (Tris-Citrate-Glucose) đến hiệu quả bảo tồn tinh của một số giống dê nuôi tại Việt Nam. Chín dê đực thuộc 3 giống dê là Saanen, Boer và Alpine (3 dê đực/giống) được khai thác tinh bằng âm đạo giả, pha loãng theo tỷ lệ 1:10 trong môi trường TCG được bổ sung 5, 10, 15 và 20% lòng đỏ trứng gà và 0,02; 0,03 và 0,04g caffeine/lít. Tinh pha loãng được bảo quản ở nhiệt độ 5°C và 15°C. Hoạt lực tinh trùng và tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của các mẫu tinh được đánh giá và so sánh sau 24 giờ, 72 giờ và 120 giờ bảo quản. Kết quả nghiên cứu cho thấy, bổ sung 0,03g caffeine/l trong môi trường TCG giúp bảo quản tinh dê tốt hơn ở cả 2 nhiệt độ. Ở nhiệt độ 5°C, môi trường TCG được bổ sung 10% lòng đỏ trứng gà cho chất lượng tinh bảo quản tốt hơn, có thể vẫn được sử dụng để dẫn tinh nhân tạo sau 72 giờ bảo quản. Ở nhiệt độ 15°C, môi trường TCG được bổ sung 10% lòng đỏ trứng gà cho chất lượng tinh bảo quản tốt hơn, có thể vẫn được sử dụng để dẫn tinh nhân tạo sau 24 giờ bảo quản.

Từ khóa: Tinh dê, môi trường bảo quản tinh, lòng đỏ trứng, caffeine.

Effects of adding chicken egg yolk and caffeine in extender on the quality of goat semen

ABSTRACT

The aims of this study were to assess the effects of adding chicken egg yolk and caffeine in TCG (Tris-Citrate-Glucose) extender on the quality of goat semen preserved some goat breeds in Vietnam. Semen samples of 9 bucks belonging to 3 goat breeds, including Saanen, Boer and Alpine, (3 bucks/breed) were collected using artificial vagina, then diluted at a ratio of 1:10 with TCG extender added 0%, 5%, 10%, 15%, and 20% chicken egg yolk and 0,02; 0,03 and 0,04g caffeine/l. The diluted semen samples were preserved at 5 and 15°C, respectively. The sperm motility and sperm morphological parameters of the preserved semen samples were assessed and compared after 24h, 72h, and 120h of preservation. Results showed that addition of 0,03g caffeine/l in TCG extender gave a better quality of preserved goat semen at both temperatures. At 5°C, TCG extender added 10% of chicken egg yolk gave a better quality of preserved goat semen and could be used for artificial insemination after 72h of preservation. At 15°C, TCG extender added 15% of chicken egg yolk resulted in a better quality of preserved goat semen and could be used for artificial insemination after 24h of preservation.

Keywords: Goat semen, semen extender, egg yolk, caffeine.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đối với các nước nhiệt đới như Việt Nam thì dê là loài vật nuôi có vai trò quan trọng trong ngành chăn nuôi. Chăn nuôi dê, cừu cung cấp nhiều sản phẩm thiết thực cho xã hội. Thịt và

sữa dê cung cấp dinh dưỡng cho người tiêu dùng, đặc biệt đối với trẻ em, người già và làm đẹp cho phụ nữ. Phân dê quay lại cải thiện độ phì cho đất, làm tăng năng suất cho cây trồng; lông, da, sừng móng của cừu, dê là nguyên liệu phục vụ cho công nghiệp nhẹ; Theo Cục Chăn nuôi, từ

năm 2016-2018, đàn dê cừu của Việt Nam tăng trưởng 15,45%; sản lượng thịt tăng gần 20%. Năm 2018, theo số liệu của Tổng cục Thống kê, Việt Nam có đàn dê và cừu trên 2,8 triệu con. Năm 2019, tốc độ tăng trưởng của đàn dê, cừu là 15,45%; sản lượng thịt hơi xuất chuồng của dê, cừu tăng gần 20%. Năm 2019, dịch tả lợn châu Phi xảy ra, Bộ NN&PTNT đã chỉ đạo tái cơ cấu ngành chăn nuôi nhằm khôi phục tất cả tiềm năng của ngành chăn nuôi, trong đó, yêu cầu tăng cơ cấu đàn động vật ăn cỏ.

Như vậy, nhu cầu con giống để đáp ứng việc tăng quy mô đàn dê đòi hỏi rất lớn. Tuy nhiên, theo khảo sát thực tế của nhóm tác giả, hiện nay, tại Việt Nam, việc nhân giống dê vẫn chủ yếu thực hiện theo phương thức truyền thống là cho nhả trực tiếp. Việc áp dụng thụ tinh nhân tạo trên dê vẫn chưa phổ biến mặc dù phương thức này đem lại hiệu quả sinh sản cao (Ngoma & cs., 2016; El-Battawy, 2019), tránh được hiện tượng cận huyết, giảm nguy cơ lây truyền dịch bệnh qua đường sinh sản, giảm số con đực, tăng hiệu quả sử dụng con giống của những cá thể đực giống chất lượng cao,...

Trong thụ tinh nhân tạo dê, hiệu quả của kỹ thuật này phụ thuộc rất nhiều vào kỹ thuật khai thác tinh, bảo quản tinh và dẫn tinh (Ngoma & cs., 2016; El-Battawy, 2019). Tinh dê có thể được bảo quản ở nhiệt độ từ 2-15°C trong các môi trường pha loãng như môi trường sodium citrate - lòng đỏ trứng, môi trường sodium citrate - fructose - lòng đỏ trứng, môi trường sữa nguyên kem hoặc sữa tách bơ) có hoặc không bổ sung lòng đỏ trứng. Trong đó, môi trường pha loãng phổ biến nhất là môi trường đệm Tris được sử dụng hiệu quả cho cả tinh dê, tinh cừu và tinh thỏ. Việc bổ sung một số chất vào môi trường bảo quản tinh động vật như PVA, PVP, lòng đỏ trứng, các chất chống oxy hóa như vitamin E, vitamin C, caffeine, alumin huyết thanh bò... có hiệu quả rất tốt giúp duy trì hoạt lực và bảo vệ tế bào tinh trùng trong quá trình bảo quản (Long, 2003; Kubovicova, 2010; Tabatabaei, 2011 (trên tinh gà); Xuyen, 2004; Mendez, 2012; Sansores, 2011 (trên tinh lợn); Pour, 2013; Asadpour, 2011 (trên tinh dê); Zhao, 2015; Ferdinand, 2014

(trên tinh bò); Sharawy, 2015 (trên tinh chuột)). Trong đó, lòng đỏ trứng gà chứa các chất cung cấp năng lượng cho tinh trùng, cung cấp nguồn protein, các lipoprotein giúp bảo vệ màng tế bào tinh trùng, chất lecithin đóng vai trò là chất bảo vệ lạnh đối với tinh trùng (Ferdinand & cs., 2014). Caffeine có tác dụng chống oxy hóa, ngăn ngừa quá trình hình thành AMP vòng hay cAMP (cyclic adenosine monophosphate) làm cho tinh trùng hạn chế vận động trong môi trường bảo quản (Sharma, 1996; Pena, 2003; Xuyen, 2004; Lanzafame, 2009; Lampiao, 2012). Ngoài ra, caffeine còn có tác dụng bảo vệ màng tinh trùng và chúng có mặt trong môi trường thụ tinh ống nghiệm với vai trò hỗ trợ cho quá trình thụ tinh.

Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu xác định được ảnh hưởng của việc bổ sung các thành phần lòng đỏ trứng gà và caffeine trong môi trường TCG đến hiệu quả bảo tồn tinh của một số giống dê nuôi tại Việt Nam. Nghiên cứu này đóng góp cho việc sử dụng các loại môi trường có hiệu quả cao trong bảo quản tinh dê phục vụ cho thụ tinh nhân tạo và có thể áp dụng để đông lạnh tinh dê giúp bảo tồn và nhân đàn các giống dê tại Việt Nam.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu tinh dê được khai thác từ 9 dê đực thuộc 3 giống là Saanen, Boer và Alpine (3 dê đực/giống).

2.2. Dụng cụ và hóa chất thí nghiệm

Hóa chất sử dụng cho thí nghiệm gồm D-Glucose, KCl, NaCl, Tris, Gentamycine, Caffeine (các hóa chất của hãng Merck, Đức), lòng đỏ trứng gà (EY). Máy móc, thiết bị và dụng cụ thí nghiệm chính gồm kính hiển vi, bể ổn nhiệt, tủ bảo ôn, tủ sấy, máy đo pH, cân kỹ thuật và cân phân tích, máy khuấy từ, buồng đếm Neubauer.

2.3. Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: đánh giá và so sánh chất lượng tinh nguyên của 3 giống dê: dê Boer

(chuyên thịt), dê Saanen (chuyên sữa), dê Alpine (chuyên sữa).

Nội dung 2: Đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung lòng đỏ trứng gà (EY) và caffeine đến chất lượng tinh bảo quản dạng lỏng ở nhiệt độ 5°C và 15°C.

Bố trí thí nghiệm:

Nội dung 1: 9 dê đực thuộc 3 giống dê (3 con/giống) được khai thác tinh bằng âm đạo giả kết hợp sử dụng con cái thí tình đang trong thời điểm động dục, tần suất khai thác 5 ngày/lần, thời gian khai thác tinh từ 8 đến 9 giờ sáng, lặp lại 10 lần. Các chỉ tiêu chất lượng tinh dịch được đánh giá riêng từng cá thể và lấy giá trị trung bình để phân tích và so sánh.

Nội dung 2: dựa vào các kết quả công bố của Sharma (1996), Pena (2003), Xuyen (2004), Lanzafame (2009), Lampiao (2012) khi nghiên cứu vai trò của caffeine trong quá trình thụ tinh ở lợn và người; hiệu quả của việc bổ sung caffeine trong môi trường pha loãng tinh lợn, từ đó đề xuất các mức hàm lượng caffeine bổ sung trong môi trường pha loãng tinh để tiến hành thử nghiệm hiệu quả bảo quản tinh dê thông qua việc đánh giá các chỉ tiêu chất lượng các mẫu tinh dê bảo quản. Mẫu tinh của các dê đực thí nghiệm được trộn đều để loại bỏ yếu tố khác biệt về cá thể và giống. Mẫu tinh được xác định các chỉ tiêu chất lượng tinh, lượng tinh thu nhận được chia đều cho số lượng các môi trường thí nghiệm và nhân đôi cho hai nhiệt độ bảo quản, tinh được pha loãng với các môi trường bảo quản có bổ sung hàm lượng khác nhau của caffeine và lòng đỏ trứng gà theo bội số pha loãng 1:10. Thí nghiệm được lặp lại 6 lần, tương ứng với 6 lần khai thác tinh với tần suất khai thác là 5 ngày/lần. Các chỉ tiêu chất lượng tinh bảo quản được đánh giá sau 24, 72 và 120 giờ sau pha loãng.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Lựa chọn con đực để khai thác tinh

Dê đực giống được chọn là các cá thể dê giống thuần thuộc 3 giống là dê Boer, dê Saanen và dê Alpine, có nguồn gốc lý lịch rõ ràng, khỏe

manh, kiểu hình đẹp, ở độ tuổi từ 2-4 tuổi. Dê đực giống có những đặc điểm đặc trưng cho phẩm giống, được thể hiện ở các đặc điểm về ngoại hình và thể chất của con vật. Dê đực giống được chọn không có bệnh tật, ngực và ức nở, chân khỏe, gót cao, không có khuyết tật.

2.4.2. Pha loãng và bảo quản tinh trùng

Sau khi đưa tinh nguyên trong vòng 10 phút từ vị trí khai thác tinh về tới phòng thí nghiệm, nhanh chóng xác định nồng độ tinh nguyên để xác định tỷ lệ pha loãng: lấy 5µl tinh nguyên cho vào dung dịch NaCl 10%, lắc đều, lấy 2 giọt cho vào 2 phía của buồng đếm hồng cầu Neu Bauer → xác định mật độ tinh trùng → tính nồng độ → lượng cần pha vào 1 liều tinh pha loãng. Ủ ấm môi trường đạt đến và duy trì ở 34°C (ít nhất 1h30 phút trước khi pha loãng tinh). Lắc đều, pha tỷ lệ 1:1, sau đó tăng dần lên tỷ lệ 1:10. Các thao tác trong quá trình pha loãng phải nhẹ nhàng (tránh gây tổn thương tinh trùng) nhưng vẫn phải đảm bảo độ phân bố đều của tinh trùng trong môi trường, tránh lây nhiễm vi sinh vật gây bệnh. Chỉ được rót môi trường vào tinh dịch, tuyệt đối không làm ngược lại. Khi rót phải rót từ từ để cho môi trường chảy theo thành bình, không được rót mạnh và trực tiếp vào tinh dịch. Ghi nhãn hiệu của liều tinh gồm thông tin về ngày pha loãng, môi trường sử dụng, nhiệt độ bảo quản. Cân bằng 90 phút ở nhiệt độ phòng để tinh trùng có thể thích nghi với môi trường mới và hạ dần nhiệt độ, sau đó cho lọ tinh pha vào bảo quản ở 2 tủ bảo ôn 5°C và 15°C. Trong thời gian bảo quản, hạn chế mở cửa tủ bảo ôn, tránh làm thay đổi nhiệt độ bảo quản ảnh hưởng đến kết quả thí nghiệm.

2.4.3. Xác định pH của tinh dịch

Sử dụng giấy quỳ xác định pH của tinh nguyên, giá trị pH được so sánh bằng phương pháp so màu, cần xác định ngay khi tinh được vận chuyển về phòng thí nghiệm (trong vòng 15 phút sau khi khai thác tinh). Việc xác định pH tinh nguyên cần được tiến hành nhanh, đảm bảo thời gian tối thiểu cho đến thời điểm pha tinh.

Bảng 1. Kết quả đánh giá chất lượng tinh của các giống dê nghiên cứu

Các chỉ tiêu chất lượng tinh	Giống dê (Mean ± SD)		
	Boer	Saanen	Alpine
Thể tích tinh dịch (V-ml)	1,32 ^a ± 0,08	1,13 ^b ± 0,08	0,95 ^c ± 0,06
Hoạt lực tinh trùng (A-%)	81,8 ^a ± 5,14	83,2 ^a ± 4,62	85,5 ^a ± 3,50
Nồng độ tinh trùng (C-tỷ tinh trùng/ml)	2,67 ^a ± 0,09	2,65 ^a ± 0,12	2,78 ^b ± 0,04
Tổng số tinh trùng tiến thẳng/lần khai thác (tỷ tinh trùng)	2,83 ^a ± 0,06	2,84 ^a ± 0,06	2,89 ^b ± 0,02
pH tinh dịch	6,87 ^a ± 0,04	6,85 ^a ± 0,03	6,81 ^b ± 0,02
Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (K-%)	12,2 ^a ± 0,25	10,37 ^b ± 0,31	14,14 ^c ± 0,37

Ghi chú: n = 10; trên cùng một dòng, các giá trị có chữ cái bên trên khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với P < 0,05. Mean: Giá trị trung bình, SD: Độ lệch chuẩn.

2.4.4. Xác định nồng độ tinh trùng

Chuẩn bị dụng cụ: ống Fancol 10ml, buồng đếm Neubauer, lamén, micropipette, đầu côn, kính hiển vi. Hóa chất sử dụng là NaCl 10%. Đối với tinh nguyên: sau khi đưa tinh nguyên về tới phòng thí nghiệm, nhanh chóng lấy 5µl tinh nguyên trộn đều trong 9.995µl dung dịch NaCl 10%, lắc đều, đưa dung dịch vào 2 phía của buồng đếm hồng cầu Neu Bauer → xác định mật độ tinh trùng → tính nồng độ → lượng cần pha vào 1 liều tinh pha loãng. Chú ý: đối với tinh nguyên, cần xác định mật độ tinh trùng thật nhanh chóng và chính xác để xác định liều lượng tinh pha. Tránh để tinh trùng chờ lâu trước lúc pha tinh làm ảnh hưởng xấu đến chất lượng tinh bảo quản.

2.4.5. Xác định tinh trùng kỳ hình

Làm tiêu bản cố định và quan sát trên kính hiển vi với độ phóng đại 1.000 lần. Cho 10µl tinh pha vào ống Eppendorf có chứa 700µl dung dịch Formolcitrát 4%. Dùng lam kính sạch, sấy khô, nhỏ một giọt tinh pha đã được cố định lên lam. Dùng lamén sạch, trong, đã sấy khô đặt nghiêng từ từ lên phần lam kính có chứa giọt tinh pha, sao cho tiêu bản được cố định mà không có bọt khí. Phần dung dịch thừa được thấm hết bằng giấy thấm. Đưa tiêu bản đã cố định lên quan sát trên kính hiển vi. Quan sát và đếm số tinh trùng kỳ hình trong tổng số 200 tế bào đã quan sát được. tỷ lệ tinh

trùng kỳ hình được tính bằng tổng số tinh trùng kỳ hình đếm được chia cho 200 tổng số tinh trùng được đếm.

2.4.6. Xác định hoạt lực tinh trùng

Xác định hoạt lực tinh trùng của tinh nguyên: nhỏ 3 giọt tinh nguyên lên lam kính, quan sát trên kính hiển vi, xác định tỷ lệ % tinh trùng tiến thẳng sau khi quan sát từ 3 giọt tinh nguyên.

2.4.7. Xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp bằng phần mềm Excel, phân tích thống kê bằng phần mềm SAS 9.0. So sánh giá trị trung bình bằng T-test với sai khác có ý nghĩa thống kê khi P < 0,05.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chất lượng tinh dịch của các giống dê nghiên cứu

Lượng tinh dịch trung bình một lần lấy tinh của các giống dê rất thấp (dao động trong khoảng 0,6-2ml). Lượng tinh dịch của các giống dê khác nhau là khác nhau và nó phụ thuộc vào từng giống. Nồng độ tinh trùng trung bình của các dê đực sử dụng trong thí nghiệm này là rất cao. Độ pH của tinh dịch ảnh hưởng tới sức sống và khả năng thụ thai của tinh trùng bởi vì pH có quan hệ tới quá trình trao đổi chất của tinh trùng thông qua hệ thống enzyme của chúng. Độ pH của các mẫu tinh dê của ba giống

dê nghiên cứu có giá trị tương đương với trung bình của loài dê. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của các mẫu tinh kiểm tra tương đối cao và có sự khác nhau có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$ giữa các giống.

So với công bố của Karagiannidis & cs. (1999) về các chỉ tiêu chất lượng tinh dê Saanen và Alpine lần lượt: thể tích tinh dịch là 1,15 và 1,27ml, nồng độ tinh trùng là 3,63 và 3,61 tỷ tinh trùng/ml, hoạt lực tinh trùng là 64,4 và 59,8%, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình là 8,41 và 10,27%. Theo công bố của Yodmingkwan & cs. (2016) về các chỉ tiêu chất lượng tinh dê Boer:

thể tích tinh dịch là 1,15ml, nồng độ tinh trùng là 3,0 tỷ tinh trùng/ml, hoạt lực tinh trùng là 80,83%, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình dưới 15%. Theo tiêu chuẩn về chất lượng tinh dê trong TCVN 9715:2013 về Dê giống - Yêu cầu kỹ thuật (chỉ mới có tiêu chuẩn đối với giống dê Boer) với yêu cầu về thể tích tinh dịch tối thiểu là 0,6ml, hoạt lực tinh trùng trên 52%, nồng độ tinh trùng trên 1,5 tỷ tinh trùng/ml. Như vậy, các cá thể đực giống thí nghiệm của 3 giống dê trong nghiên cứu này có chất lượng tinh tương đối tốt, tương đương với công bố của các tác giả trên thế giới và Việt Nam.

Bảng 2. Hoạt lực tinh trùng được bảo quản ở 5°C trong các môi trường TCG có bổ sung lòng đỏ trứng gà và caffeine (%)

Môi trường	Thời gian bảo quản (Mean ± SD)		
	24 giờ	72 giờ	120 giờ
Môi trường TCG	74,26 ^a ± 1,81	57,78 ^c ± 2,89	36,80 ^b ± 2,45
Môi trường TCG + 0,02g/l caffeine	75,19 ^a ± 2,69	57,96 ^c ± 2,50	36,30 ^b ± 2,33
Môi trường TCG + 0,03g/l caffeine	75,37 ^a ± 1,33	62,78 ^b ± 2,53	37,60 ^b ± 2,90
Môi trường TCG + 0,04g/l caffeine	74,44 ^a ± 1,60	57,41 ^c ± 2,55	35,93 ^b ± 1,98
Môi trường TCG + 5% lòng đỏ trứng gà	74,07 ^a ± 1,98	62,85 ^b ± 3,44	40,19 ^a ± 2,19
Môi trường TCG + 10% lòng đỏ trứng gà	74,82 ^a ± 2,94	66,11 ^a ± 2,53	42,04 ^a ± 2,50
Môi trường TCG + 15% lòng đỏ trứng gà	73,70 ^a ± 2,23	63,15 ^b ± 2,46	40,74 ^a ± 2,28
Môi trường TCG + 20% lòng đỏ trứng gà	73,89 ^a ± 2,12	62,96 ^b ± 2,50	40,56 ^a ± 1,60

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị có chữ cái bên trên khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$; Mean: Giá trị trung bình; SD: Độ lệch chuẩn.

Bảng 3. Hoạt lực tinh trùng được bảo quản ở 15°C trong các môi trường TCG có bổ sung lòng đỏ trứng gà và caffeine (%)

Môi trường	Thời gian bảo quản (Mean ± SD)		
	24 giờ	72 giờ	120 giờ
Môi trường TCG	73,52 ^a ± 2,33	56,85 ^b ± 2,82	37,78 ^b ± 2,53
Môi trường TCG + 0,02 g/l caffeine	73,15 ^a ± 2,46	57,41 ^b ± 2,55	39,07 ^b ± 1,98
Môi trường TCG + 0,03 g/l caffeine	74,44 ^a ± 1,60	62,04 ^a ± 2,50	42,04 ^a ± 2,50
Môi trường TCG + 0,04 g/l caffeine	72,78 ^a ± 2,53	56,67 ^b ± 2,40	38,52 ^b ± 2,33
Môi trường TCG + 5% lòng đỏ trứng gà	73,14 ^a ± 2,46	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Môi trường TCG + 10% lòng đỏ trứng gà	73,40 ^a ± 2,33	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Môi trường TCG + 15% lòng đỏ trứng gà	74,63 ^a ± 2,37	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Môi trường TCG + 20% lòng đỏ trứng gà	73,33 ^a ± 2,40	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị có chữ cái bên trên khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$; Mean: Giá trị trung bình; SD: Độ lệch chuẩn.

3.2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung lòng đỏ trứng gà và caffeine trong môi trường đến chất lượng tinh bảo quản

3.2.1. Ảnh hưởng của việc bổ sung lòng đỏ trứng và caffeine trong môi trường đến hoạt lực tinh bảo quản

Chỉ tiêu hoạt lực tinh trùng được coi là chỉ tiêu quan trọng nhất đối với việc đánh giá chất lượng tinh trùng bảo quản, thể hiện khả năng thụ tinh của liều tinh pha loãng. Kết quả đánh giá chỉ tiêu hoạt lực tinh trùng của các liều tinh pha loãng bằng 8 môi trường thí nghiệm ở nhiệt độ 5°C và 15°C theo thời gian bảo quản được thể hiện lần lượt trong bảng 2 và 3.

Kết quả theo dõi hoạt lực của tinh bảo quản tại các mốc thời gian khác nhau cho thấy hoạt lực của tinh trùng giảm dần theo thời gian. Sau 24 giờ bảo quản (ngày thứ nhất sau khai thác và bảo quản tinh), hoạt lực tinh trùng của các liều tinh được bảo quản trong các môi trường TCG, môi trường TCG + 0,02 g/l caffeine, môi trường TCG + 0,03 g/l caffeine, môi trường TCG + 0,04 g/l caffeine, môi trường TCG + 5% EY (EY là viết tắt của lòng đỏ trứng gà), môi trường TCG + 10% EY, môi trường TCG + 15% EY, môi trường TCG + 20% EY không có sự sai khác giữa các môi trường. Tại thời điểm bảo quản 72 giờ, hoạt lực tinh trùng được bảo quản trong môi trường TCG, môi trường TCG + 0,02 g/l caffeine, môi trường TCG + 0,04 g/l caffeine thấp hơn so với hoạt lực tinh trùng của các liều tinh được bảo quản trong môi trường TCG + 0,03 g/l caffeine, môi trường TCG + 5% EY, môi trường TCG + 10% EY, môi trường TCG + 15% EY, môi trường TCG + 20% EY. Kết quả tại thời điểm 72 giờ sau bảo quản được trình bày ở Bảng 3.3. Như vậy, hoạt lực tinh trùng được bảo quản trong môi trường TCG + 5% EY, môi trường TCG + 10% EY, môi trường TCG + 15% EY, môi trường TCG + 20% EY ổn định và giảm nhẹ theo thời gian so với các môi trường TCG, môi trường TCG + 0,02g/l caffeine, môi trường TCG + 0,03 g/l caffeine, môi trường TCG + 0,04 g/l caffeine. Theo yêu cầu kỹ thuật đối với tinh dê bảo quản đủ điều kiện thụ tinh nhân tạo (Nguyễn Tấn

Anh, 1995), hoạt lực của tinh trùng >60% mới đạt tiêu chuẩn thụ tinh. Hoạt lực tinh trùng của các liều tinh được bảo quản bằng các môi trường sau 120 giờ bảo quản đều thấp hơn 60%, không đủ tiêu chuẩn thụ tinh nhân tạo. Như vậy, ở 5°C môi trường TCG có bổ sung EY thích hợp để bảo quản tinh trùng dê dạng lỏng. Ở nhiệt độ này, hàm lượng caffeine và EY tốt nhất khi bổ sung vào môi trường bảo quản lần lượt là: 0,03 g/l và 15%. Việc bổ sung caffeine trong môi trường pha loãng tinh giúp bảo quản tinh dê tốt hơn, tương đồng với kết quả nghiên cứu của Xuyen L.T. (2004) khi nghiên cứu bổ sung caffeine trong môi trường bảo quản tinh lợn.

Kết quả theo dõi hoạt lực của tinh bảo quản tại các mốc thời gian khác nhau cho thấy hoạt lực của tinh trùng giảm dần theo thời gian. Sau 24 giờ bảo quản (ngày thứ nhất sau khai thác và bảo quản tinh), hoạt lực tinh trùng của các liều tinh được bảo quản trong các môi trường TCG, môi trường TCG + 0,02 g/l caffeine, môi trường TCG + 0,03 g/l caffeine, môi trường TCG + 0,04 g/l caffeine, môi trường TCG + 5% EY, môi trường TCG + 10% EY, môi trường TCG + 15% EY, môi trường TCG + 20% EY không có sự sai khác không rõ rệt giữa các môi trường. Tại 72 giờ bảo quản hoạt lực tinh trùng của môi trường TCG + 0,03 g/l caffeine đạt cao nhất là $62,04 \pm 2,50$ cho phép bảo quản tinh và phối tối ngày thứ 3 (72 giờ sau bảo quản). Môi trường TCG có bổ sung lòng đỏ trứng gà ở các hàm lượng khác nhau có hoạt lực bằng 0. Hoạt lực tinh trùng của các liều tinh được bảo quản bằng các môi trường sau 120 giờ bảo quản đều nhỏ hơn 60%, không đủ tiêu chuẩn thụ tinh nhân tạo. Theo số liệu Bảng 3.4, ta thấy môi trường TCG có bổ sung lòng đỏ trứng gà không thích hợp sử dụng trong môi trường pha loãng dài ngày ở nhiệt độ 15°C. Hàm lượng caffeine tốt nhất cho bảo quản tinh trùng là 0,03 g/l. Từ các kết quả trên, có thể thấy ở nhiệt độ 15°C các chất bổ sung với hàm lượng tối ưu cho hoạt lực tinh bảo quản là: 0,03 g/l caffeine, 15% EY. Còn đối với 5°C các chất bổ sung với hàm lượng tối ưu cho hoạt lực tinh bảo quản của caffeine và EY lần lượt là: 0,03 g/l; 10%.

3.2.2. Kết quả chỉ tiêu tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh pha loãng bằng các môi trường khác nhau theo thời gian bảo quản

Tinh trùng kỳ hình là chỉ tiêu quan trọng đánh giá chất lượng tinh pha loãng tại các thời điểm kiểm tra chất lượng tinh trùng bảo quản, vì tỷ lệ tinh trùng kỳ hình liên quan đến khả năng thụ tinh của tinh trùng. Tinh trùng kỳ hình có hình thái học không bình thường ở đầu, cổ, thân, đuôi. Chúng không có khả năng thụ tinh. Nếu tỷ lệ tinh trùng kỳ hình quá nhiều thì tỷ lệ tinh trùng có khả năng thụ tinh thấp, liều tinh đó sẽ bị loại bỏ. Theo tiêu chuẩn kỹ thuật, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh bảo quản đạt yêu cầu kỹ thuật cho thụ tinh nhân tạo là dưới 20%.

Tỷ lệ % tinh trùng kỳ hình tổng số của các mẫu tinh dịch pha loãng, bảo quản bằng 8 loại môi trường thí nghiệm ở nhiệt độ 5°C và 15°C được thể hiện ở bảng 4 và 5.

Theo kết quả trình bày trong bảng 4, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở 5°C của các mẫu tăng theo thời gian bảo quản, ở mẫu tinh pha loãng bằng môi trường TCG + 20% EY và môi trường TCG + 0,04 g/l caffeine có tỷ lệ tinh trùng kỳ hình tương đương nhau nhưng đều thấp hơn so với giá trị 20%. Trên cơ sở đó, 8 môi trường nghiên cứu đều cho tỷ lệ tinh trùng kỳ hình đạt so với yêu cầu về chỉ tiêu tinh trùng kỳ hình theo tiêu chuẩn kỹ thuật ở tất cả các mốc thời gian bảo quản.

Bảng 4. Ảnh hưởng của lòng đỏ trứng gà và caffeine trong môi trường đến tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh bảo quản ở 5°C (%)

Môi trường	Thời gian bảo quản (Mean ± SD)		
	24 giờ	72 giờ	120 giờ
Môi trường TCG	11,86 ^a ± 0,41	13,44 ^a ± 0,34	15,74 ^a ± 0,38
Môi trường TCG + 0,02 g/l caffeine	11,53 ^a ± 0,40	12,58 ^b ± 0,46	14,97 ^b ± 0,47
Môi trường TCG + 0,03 g/l caffeine	11,67 ^a ± 0,38	12,78 ^b ± 0,43	15,61 ^a ± 0,32
Môi trường TCG + 0,04 g/l caffeine	11,89 ^a ± 0,44	13,25 ^a ± 0,43	15,78 ^a ± 0,26
Môi trường TCG + 5% lòng đỏ trứng	10,89 ^b ± 0,32	12,33 ^b ± 0,34	14,67 ^b ± 0,66
Môi trường TCG + 10% lòng đỏ trứng	10,94 ^b ± 0,34	12,47 ^b ± 0,53	14,89 ^b ± 0,63
Môi trường TCG + 15% lòng đỏ trứng	11,14 ^b ± 0,29	12,78 ^b ± 0,52	15,11 ^b ± 0,53
Môi trường TCG + 20% lòng đỏ trứng	11,61 ^a ± 0,21	13,31 ^a ± 0,52	15,78 ^a ± 0,43

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị có chữ cái bên trên khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$; Mean: Giá trị trung bình; SD: Độ lệch chuẩn.

Bảng 5. Ảnh hưởng của lòng đỏ trứng gà và caffeine trong môi trường đến tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh bảo quản ở 15°C (%)

Môi trường	Thời gian bảo quản (Mean ± SD)		
	24 giờ	72 giờ	120 giờ
Môi trường TCG	13,22 ^a ± 0,35	15,17 ^a ± 0,24	16,81 ^a ± 0,43
Môi trường TCG + 0,02 g/l caffeine	12,83 ^a ± 0,42	14,86 ^a ± 0,29	16,19 ^b ± 0,46
Môi trường TCG + 0,03 g/l caffeine	12,92 ^a ± 0,39	14,92 ^a ± 0,31	16,56 ^a ± 0,24
Môi trường TCG + 0,04 g/l caffeine	13,19 ^a ± 0,35	15,06 ^a ± 0,34	16,61 ^a ± 0,32
Môi trường TCG + 5% lòng đỏ trứng	12,03 ^b ± 0,46	-	-
Môi trường TCG + 10% lòng đỏ trứng	12,11 ^b ± 0,44	-	-
Môi trường TCG + 15% lòng đỏ trứng	12,28 ^b ± 0,49	-	-
Môi trường TCG + 20% lòng đỏ trứng	12,33 ^b ± 0,45	-	-

Ghi chú: Trên cùng một cột, các giá trị có chữ cái bên trên khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$; Mean: Giá trị trung bình; SD: Độ lệch chuẩn.

Ở nhiệt độ bảo quản là 15°C thì tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của các liều tinh bảo quản có xu hướng tăng theo thời gian bảo quản và được trình bày cụ thể ở bảng 5. Theo đó, môi trường TCG có tỷ lệ tinh trùng kỳ hình cao nhất ($16,81 \pm 0,43$) nhưng vẫn nằm trong ngưỡng giới hạn (<20%). Theo tiêu chuẩn kỹ thuật đối với chỉ tiêu tinh trùng kỳ hình cho các liều tinh bảo quản thì 8 môi trường đều đạt yêu cầu cho phối.

4. KẾT LUẬN

Việc bổ sung caffeine với hàm lượng 0,03 g/l môi trường TCG cho hiệu quả bảo tồn tinh dê tốt hơn ở cả 2 nhiệt độ. Nếu bảo quản tinh ở nhiệt độ 5°C thì lòng đỏ trứng gà nên được bổ sung vào môi trường TCG với hàm lượng 10%, có thể kéo dài thời gian bảo quản tinh đảm bảo cho thụ tinh cho tới 72 giờ. Nếu bảo quản tinh ở nhiệt độ 15°C, nên bổ sung 15% lòng đỏ trứng gà, tuy nhiên thời gian bảo quản tinh dê không quá 24 giờ. Nên có những nghiên cứu tiếp theo thử nghiệm trong thực tế để kiểm chứng chất lượng tinh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Asadpour R., Jafari R. & Nasrabadi H.T. (2011). Influence of Added Vitamin C and Vitamin E on Frozen-Thawed Bovine Sperm Cryopreserved in Citrate and Tris-Based Extenders. *Veterinary Research Forum*. 2(1): 37-44.

El-Battawy K.A. (2019). Preservation of goat semen at 5°C with emphasis on its freezability and the impact of melatonin. *Int J Vet Sci Res*. 5(2): 035-038

Ferdinand N., Ngwa T.D., Augustave K., Dieudonné B.P.H., Willington B.O., D'Alex T.C., Pierre K. & Joseph T. (2014). Effect of Egg Yolk Concentration in Semen Extender, pH Adjustment of Extender and Semen Cooling Methods on Bovine Semen Characteristics. *Global Veterinaria*. 12 (3): 292-298.

Karagiannidis A., Varsakeli S. & Karatzas G. (1999). Characteristics and seasonal variations in the semen of Alpine, Saanen and Damascus goat bucks born and raised in Greece. *Thriogenology*. 53: 1285-1293.

Kubovičová, Ríha L., Makarevich A.V., Apolen D. & Pivko J. (2010). Effect of different semen

extenders and additives to insemination doses on ewe's pregnancy rate. *Slovak J. Anim. Sci*. 43(3): 118-122.

Lampiao F. (2012). Free radicals generation in an *in vitro* fertilization setting and how to minimize them. *World Journal of Obstetrics and Gynecology*. 1: 29-34.

Lanzafame F.M., La Vignera S., Vicari E. & Calogero A.E. (2009). Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reproductive Bio Medicine Online*. 19: 638-59.

Long J.A. & Kramer M. (2003). Effect of vitamin E on lipid peroxidation and fertility after artificial insemination with liquid-stored turkey semen. *Poultry Science*. 82: 1802-1807.

Memon A.A., Wahid H., Rosnina Y., Goh Y.M., Ebrahimi M., Nadia F.M. & Audrey G. (2011). Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen. *Animal Reproduction Science*. 129(1-2): 44-49.

Mendez M.F.B., Zangeronimo M.G., Rocha L.G.P., Faria B.G., Pereira B.A., Fernandes C.D., Chaves B.R., Murgas L.D.S. & Sousa R.V. (2012). Effect of the addition of IGF-I and vitamin E to stored boar semen. *Animal*. 7(5): 93-798. doi:10.1017/S1751731112002285.

Nguyễn Tấn Anh (1995). Một số kết quả bước đầu nghiên cứu về dê đực Bách Thảo. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ và Quản lý kinh tế*. 8: 296-297.

Ngoma L., Kambulu L. & Mwanza M. (2016). Factors Influencing Goat's Semen Fertility and Storage A Literature Review. *Journal of Human Ecology*. 561(2): 114-125

Pech-Sansores A.G.C., Centurión-Castro F.G., Rodríguez-Buenfil J.C., Segura-Correa J.C., Aké-Lope J.R. (2011). Effect of the addition of seminal plasma, vitamin E and incubation time on post-thawed sperm viability in boar semen. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14: 965-971.

Pena F.J., Johannisson A., Wallgren M. & Rodriguez Martinez H. (2003). Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Animal Reproduction Science*. 78: 85-98.

Pour H.A., Tahmasbi A.M. & Naserain A.A. (2013). The influence of vitamin E on semen characteristics of ghezel rams in during cooling and frozen process. *European Journal of Zoological Research*. 2(5): 94-99.

Sharawy S.M., Saleh N.H., Attalah S.A., Absy G.M. & Doaa H.K. (2015). Studies on the effect of added

- ascorbic acid and trehalose to tris buffered egg yolk extender on chilled ram semen. *MENA Science Journal - MENASJ*. 1(1): 1-4.
- Sharma R.K. & Agarwal A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*. 48: 835-850.
- Tabatabaei S., Batavani R. & Ayen E. (2011). Effects of vitamin e addition to chicken semen on sperm quality during in vitro storage of semen. *Veterinary Research Forum*. 2(2): 103-111 .
- Tiêu chuẩn Việt Nam (2013) - TCVN 9715:2013 về Dê giống - Yêu cầu kỹ thuật.
- Xuyen L.T. (2004). Influence of extender components on the liquid preservation of boar sperm. PhD thesis, Hannover University of Veterinary Medicine, Germany.
- Yodmingkwan P., Guntaprom S., Jaksamrit J. & Lertchunhakiat K. (2016). Effects of Extenders on Fresh and Freezing Semen of Boer Goat. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 11: 125-130
- Zhao X.L., Li Y.K., Cao S.J., Hu J.H., Wang W.H., Hao R.J., Gui L.S. & Zan L.S. (2015). Protective effects of ascorbic acid and vitamin E on antioxidant enzyme activity of freeze-thawed semen of Qinchuan bulls.