

ẢNH HƯỞNG CỦA PHƯƠNG PHÁP HẠ NHIỆT ĐẾN CHẤT LƯỢNG TINH DỊCH LỢN BẢO QUẢN Ở NHIỆT ĐỘ THẤP

**Bùi Huy Doanh^{1*}, Đinh Thị Yên¹, Cù Thị Thiên Thu¹, Nguyễn Ngọc Kiên²,
Nguyễn Thị Tuyết Lê¹, Đặng Thái Hải¹, Phạm Kim Đăng¹**

¹*Khoa Chăn nuôi, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*
²*Công ty CP Giống gia súc Hà Nội*

*Tác giả liên hệ: bhdoanh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 31.08.2020

Ngày chấp nhận đăng: 08.12.2020

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành trên 720 mẫu tinh dịch của 6 lợn Duroc nhằm đánh giá ảnh hưởng của các phương pháp hạ nhiệt khác nhau tới chất lượng tinh dịch khi bảo quản ở nhiệt độ thấp trong môi trường không chứa kháng sinh. Tinh dịch được pha loãng trong môi trường BTS cải biến không có kháng sinh. Các mẫu tinh dịch được hạ từ 30°C xuống 5°C theo 5 cách khác nhau trước khi bảo quản ở 5°C. Các mẫu tinh dịch được kiểm tra sau 24, 48, 72 và 120 giờ bảo quản. Kết quả cho thấy, mẫu hạ nhiệt độ chậm nhất (5-A4: 2 giờ ở nhiệt độ phòng sau đó bảo quản ở 10°C trong 3 giờ) có hoạt lực tinh trùng, tỷ lệ tồn thương màng acrosome cũng như tỷ lệ tinh trùng kỳ hình qua các ngày bảo quản không sai khác so với mẫu tinh dịch được bảo quản ở 17°C ($P > 0,05$). Quá trình hạ nhiệt nhanh và bảo quản trực tiếp ở 5°C (5-A0 sau pha loãng bảo quản trực tiếp ở 5°C) đã làm giảm hoạt lực của tinh trùng và tăng tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ($P < 0,05$). Thời gian bảo quản có ảnh hưởng đến hoạt lực tinh trùng ($P < 0,05$). Do đó, phương pháp thích hợp để bảo quản tinh ở nhiệt độ thấp là có tốc độ hạ nhiệt chậm ở nhiệt độ phòng và 10°C trước khi đem bảo quản ở 5°C.

Từ khóa: Tinh dịch, bảo quản, chất lượng tinh, nhiệt độ.

Effects of Cooling Methods on Sperm Quality in Boar Semen Preservation at Low Temperature

ABSTRACT

This study was conducted on 720 semen samples of six Duroc boars to evaluate the effects of the different cooling methods on semen quality when stored at low temperatures in an extender without antibiotics. Semen was diluted in a modified BTS extender without antibiotics. Semen samples were cooled from 30°C to 5°C using five different cooling rates before stored at 5°C. Diluted semen was investigated after 24h, 48h, 72h and 120h of preservation. The results showed that: the lowest cooling rate sample (5-A4: 2h at room temperature, then stored at 10°C for 3 h) had sperm motility, abnormal acrosome, as well as morphology in different days of storage, which did not differ from semen samples stored at 17°C ($P > 0.05$). Rapid cooling rate and direct storage at 5°C (5-A0 stored immediately at 5°C after dilution) were reduced sperm motility as well as increased abnormal spermatozoa ($P < 0.05$). Time storage has influenced sperm motility ($P < 0.05$). Therefore, an optimal cooling rate (slowly cooling rate at room temperature and 10°C before stored at 5°C) for hypothermic storage was established for antibiotic-free storage at 5°C.

Keywords: Semen, preservation, semen quality, temperature.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quá trình khai thác và bảo quản tinh dịch lợn ở nước ta hiện nay chưa được quan tâm thích đáng. Tinh dịch lợn chủ yếu vẫn được cung cấp trực tiếp cho các trang trại trong hệ thống

hoặc các địa phương lân cận. Các nghiên cứu hiện nay chủ yếu đề cập đến chất lượng tinh được bảo quản ở nhiệt độ 17°C (Hà Xuân Bộ & cs., 2011; Hà Xuân Bộ & cs., 2013). Nghiên cứu về bảo quản ở nhiệt độ thấp cũng như ảnh hưởng của nhiệt độ thấp đến hoạt lực cũng như

khả năng thụ tinh của tinh trùng hầu như chưa được chú trọng. Bảo quản tinh dịch lợn ở nhiệt độ thấp có nhiều ưu điểm: giảm sự trao đổi chất ở tinh trùng, giảm sự phát triển của vi khuẩn cũng như hạn chế việc sử dụng kháng sinh trong môi trường bảo quản. Tuy nhiên, đặc điểm cấu tạo tinh trùng lợn cũng có nhiều điểm khác biệt so với tinh trùng động vật khác nên khả năng bảo quản ở nhiệt độ thấp vẫn còn hạn chế. Đặc biệt, do đặc điểm thành phần của lớp phospholipid trên màng tinh trùng của lợn có nhiều điểm khác biệt so với tinh trùng của động vật khác như lượng cholesterone thấp, tỷ lệ axit béo không bão hòa/axit béo bão hòa cao nên tinh trùng lợn rất mẫn cảm với nhiệt độ nói chung và shock lạnh nói riêng (Yeste, 2015).

Do quá trình khai thác, pha loãng và bảo quản tinh dịch không phải là quy trình vô trùng nên rất dễ bị nhiễm khuẩn, có thể đây là một trong những nguyên nhân ảnh hưởng đến chất lượng tinh dịch theo thời gian bảo quản, dẫn đến tỷ lệ thụ thai giảm. Trong quá trình bảo quản, vi khuẩn có mặt trong tinh dịch sẽ ảnh hưởng đến khả năng di chuyển của tinh trùng và tạo ra những bất thường về mặt hình thái của tinh trùng (Auroux & cs., 1991; Ubeda & cs., 2013), gây đông vón tinh dịch (Wolff & cs., 1993), khả năng sống sót thấp và giảm tính toàn vẹn của màng acrosome (El-Mulla & cs., 1996; Sepúlveda & cs., 2014). Bên cạnh đó, một số vi khuẩn còn thải các độc tố, tranh chấp dinh dưỡng với tinh trùng làm giảm khả năng bảo tồn của tinh dịch, giảm tỷ lệ thụ thai hoặc có thể gây quái thai. Hơn nữa, vi khuẩn còn làm tăng khả năng truyền bệnh từ đực giống sang nhiều con cái khác. Vi khuẩn cũng có thể làm giảm sức khỏe và khả năng thụ thai của con cái do gây viêm nội mạc tử cung và gây chết phôi, thai (Payne & cs., 2008; Martin & cs., 2010). Trước những ảnh hưởng xấu của vi khuẩn đối với chất lượng tinh dịch nên việc bổ sung kháng sinh vào môi trường pha loãng và bảo quản tinh dịch lợn là hết sức cần thiết. Tuy nhiên, việc bổ sung kháng sinh vào môi trường cũng có nhiều ảnh hưởng xấu như làm xuất hiện các chủng vi khuẩn kháng kháng sinh gây khó khăn trong điều trị bệnh trên vật nuôi (Speck & cs., 2014; Schulze & cs., 2017). Giải pháp bảo quản tinh không có kháng sinh đã được đề cập và nghiên

cứu. Trong đó, bảo quản ở nhiệt độ thấp cũng là một giải pháp làm giảm khả năng phát triển của vi khuẩn. Một số nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* về việc bảo quản và sử dụng tinh trùng ở 5°C đã được thực hiện (Schmid & cs., 2013a; Schmid & cs., 2013b; Waberski & cs., 2019a). Tuy nhiên, việc nghiên cứu chế độ hạ nhiệt độ từ khoảng 35°C sau khi khai thác, 28-30°C sau khi pha loãng xuống 5°C vẫn còn nhiều hạn chế. Việc cân bằng nhiệt độ ở nhiệt độ phòng sau khi khai thác xuống nhiệt độ bảo quản có ý nghĩa to lớn. Nghiên cứu vấn đề này giúp cho việc bảo quản tinh dịch tránh bị sốc khi thay đổi nhiệt độ đột ngột với tinh trùng ảnh hưởng tới chất lượng tinh trùng. Vì vậy, việc xác định phương pháp làm mát phù hợp là rất cần thiết để đảm bảo chất lượng tinh trùng khi bảo quản ở 5°C. Xuất phát từ thực tế đó, nghiên cứu này nhằm thiết lập một sự tương quan tối ưu giữa thời gian và nhiệt độ cân bằng trước khi bảo quản tinh dịch mà không làm giảm chất lượng tinh trong quá trình bảo quản ở nhiệt độ thấp.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Có 720 mẫu tinh dịch được khai thác từ 06 lợn đực Duroc (khỏe mạnh, 1,5-4 năm tuổi, có hoạt lực tối thiểu là 70% và hình thái tinh trùng bình thường trên 75%) nuôi tại Công ty CP Giống gia súc Hà Nội từ tháng 5 đến tháng 7/2020.

2.2. Nội dung nghiên cứu

Tinh dịch lợn sau khi khai thác được kiểm tra thể tích, nồng độ và hoạt lực trước khi pha trong môi trường bảo quản dạng lỏng Beltsville Thawing Solution (BTS) tự pha (Glucose, Hepes, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, KCl, NaHCO_3 , Ethylene Diaminete Traacetic Axit (EDTA), 330 mOsmol/l; pH 7,00) (Johnson & cs., 2000). Tinh dịch được pha trong 5 liều (90 ml/liều, 20 triệu tinh trùng/ml) dùng phân tích hoạt lực và tỷ lệ tinh trùng kỳ hình trong các ngày khác nhau. Tinh pha loãng được bảo quản ở 17°C được bổ sung thêm 25mg Gentamicin/ml trong khi tinh pha loãng bảo quản ở 5°C không được bổ sung kháng sinh. Các tủ lạnh ổn nhiệt có hệ thống điều khiển và theo dõi nhiệt độ.

Mẫu tinh dịch bảo quản ở 17°C sẽ được để ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 2 giờ trước khi cho vào tủ bảo quản ở 17°C. Năm mẫu tinh dịch bảo quản ở 5°C được làm mát theo các phương pháp khác nhau:

5-A0: sau pha loãng bảo quản trực tiếp tại 5°C

5-A1: sau pha loãng để 2 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó bảo quản ở 5°C

5-A2: sau pha loãng để 5 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó bảo quản ở 5°C

5-A3: sau pha loãng bảo quản tiếp 5 giờ ở 10°C, sau đó bảo quản ở 5°C

5-A4: sau pha loãng để 2 giờ ở nhiệt độ phòng bảo quản tiếp ở 10°C trong 3 giờ, sau đó mới bảo quản ở 5°C.

Hoạt lực tinh trùng của các mẫu tinh dịch theo các phương pháp làm mát khác nhau trước khi bảo quản ở 5°C được đánh giá (24, 48, 72 và 120 giờ) sau khi bảo quản. Đánh giá sự tổn thương màng acrosome của các phương pháp làm mát trước khi bảo quản ở 5°C ở các thời điểm (24, 48, 72 và 120 giờ) sau khi bảo quản. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (đầu, cổ và đuôi) của các mẫu tinh nguyên và các phương pháp hạ nhiệt trước khi bảo quản được xác định sau 24, 48, 72 và 120 giờ bảo quản.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Tinh dịch khai thác từ lợn đực giống được chọn vào buổi sáng với chu kỳ khai thác 1 lần/tuần, có hoạt lực tối thiểu là 70% và hình thái tinh trùng bình thường trên 75%.

Hoạt lực tinh trùng (A , $0\% \leq A \leq 100\%$) được xác định bằng hệ thống phân tích tinh dịch tự động (Computer assisted sperm analysis, AndroVision® (Minitube, Đức)), sử dụng lam kính bốn buồng đếm với độ sâu 20µm (Leja,

Nieuw Venne, Nederlands) với kính hiển vi với độ phóng đại 100 lần.

Nồng độ tinh trùng (C , triệu/ml) được xác định bằng buồng đếm Neubauer trên kính hiển vi có độ phóng đại 400 lần được mô tả bởi Paulenz & cs. (1995).

Tổng số tinh trùng tiến thẳng (VAC, tỷ/lần) được xác định bằng tích của ba chỉ tiêu V , A và C .

Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (K , %) được xác định bằng số tinh trùng kỳ hình trên tổng số 200 tinh trùng trong dung dịch 4% formol citrate trên kính hiển vi có độ phóng đại 1.000 lần với vật kính soi dầu. Hình thái bất thường của tinh trùng được xác định thông qua việc kiểm tra hình dáng của đầu, màng acrosome, cổ và đuôi tinh trùng. Phần đầu tinh trùng: tinh trùng kỳ hình đầu; acrosome bị hỏng: bong màng, màng không cân đối, màng quá mỏng; sự có mặt của các giọt bào tương ở phần đầu. Phần cổ tinh trùng: tinh trùng kỳ hình cổ và sự có mặt của các giọt bào tương ở cổ. Phần thân tinh trùng: tinh trùng kỳ hình thân và sự có mặt của các giọt bào tương ở thân. Phần đuôi tinh trùng: tinh trùng kỳ hình đuôi và sự có mặt của các giọt bào tương ở đuôi.

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm MS Excel 365 và Graphpad Prism 6. So sánh sự sai khác giữa các giá trị trung bình bằng phép thử Tukey trong phương pháp phân tích phương sai hai nhân tố (ANOVA) sử dụng mô hình tuyến tính tổng quát (GLM) như sau:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha_i \beta_j) + \varepsilon_{ij}$$

Trong đó: μ : trung bình chung; α_i : ảnh hưởng của phương pháp hạ nhiệt; β_j : ảnh hưởng của thời gian bảo quản; $(\alpha_i \beta_j)$: tương tác giữa phương pháp hạ nhiệt và thời gian bảo quản; ε_{ij} : sai số ngẫu nhiên.

Bảng 1. Chất lượng tinh dịch của lợn đực Duroc sau khai thác

Chỉ tiêu	$\bar{X} \pm SD$	Cv (%)
V (ml)	235,67 ± 39,41	16,72
A (%)	86,17 ± 4,09	4,74
C (triệu/ml)	331,00 ± 50,57	15,28
VAC (tỷ/lần)	67,21 ± 0,08	19,64
K (%)	8,90 ± 3,54	39,74

**Bảng 2. Hoạt lực tinh trùng qua các ngày bảo quản ở 17°C
và các mức hạ nhiệt khác nhau trước khi bảo quản ở 5°C**

Mức hạ nhiệt và nhiệt độ bảo quản	Hoạt lực sau các mốc thời gian bảo quản (n = 30, $\bar{X} \pm SD$) (%)			
	24h	48h	72h	120h
17°C	82,17 ^{aA} ± 3,64	77,17 ^{bA} ± 3,39	74,33 ^{cA} ± 4,30	70,33 ^{dA} ± 3,92
5-A0	41,50 ^{aB} ± 5,59	35,67 ^{bB} ± 4,87	33,33 ^{bB} ± 4,61	32,83 ^{bB} ± 3,87
5-A1	45,83 ^{aC} ± 4,17	40,67 ^{bC} ± 3,88	36,33 ^{cBC} ± 3,46	35,83 ^{cBC} ± 3,24
5-A2	48,83 ^{aC} ± 4,49	44,33 ^{bC} ± 5,04	38,83 ^{cC} ± 4,86	38,67 ^{cC} ± 4,90
5-A3	57,67 ^{aD} ± 7,63	54,17 ^{abD} ± 7,89	49,50 ^{bcD} ± 7,81	45,33 ^{cd} ± 5,71
5-A4	71,33 ^{aA} ± 4,14	67,83 ^{bA} ± 5,17	65,67 ^{bA} ± 6,79	60,50 ^{cA} ± 4,18

Ghi chú: Các chữ cái in thường khác nhau trong cùng một dòng (a-d) cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê qua các ngày bảo quản (P < 0,05); Các chữ cái in hoa khác nhau trong cùng một cột (A-D) cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu bảo quản ở 17°C và các mức hạ nhiệt khác nhau (P < 0,05).

3. KẾT QUẢ

Chất lượng tinh nguyên của 6 lợn đực Duroc trung bình đạt 235 ml/lần khai thác với hoạt lực là 86,17% và nồng độ tinh trùng là 331 triệu/ml. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của tinh nguyên khoảng 8,9% (Bảng 1). Các chỉ tiêu này đều phù hợp với tiêu chuẩn quốc gia TCVN 9111:2011 về giống lợn ngoại - Yêu cầu kỹ thuật.

Hoạt lực tinh trùng bị giảm trong quá trình bảo quản và làm mát nên đây là yếu tố quan trọng trong thụ tinh nhân tạo của lợn, giới hạn thấp nhất được sử dụng là 65% (Waberski & cs., 2019b). Kết quả cho thấy, tốc độ hạ nhiệt và thời gian bảo quản có ảnh hưởng đến hoạt lực tinh trùng ở cả mẫu bảo quản ở 17°C và 5°C (P < 0,05) (Bảng 2). Trong các mẫu tinh dịch bảo quản ở 5°C thì tinh dịch sau pha loãng có tốc độ hạ nhiệt thấp 5-A4 (2 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó 3 giờ ở 10°C) có hoạt lực tinh trùng tốt nhất qua các ngày bảo quản (P < 0,05). Hoạt lực của tinh trùng sau 24, 48, 72 và 120 giờ cho mẫu hạ nhiệt độ 5-A4 lần lượt là 71,33 ± 4,14%, 67,83 ± 5,17%, 65,67 ± 6,79% và 60,50 ± 4,18%. Tinh dịch có tốc độ hạ nhiệt nhanh xuống 5°C: 5-A0 (sau pha loãng, bảo quản ngay ở 5°C), 5-A1 (sau pha loãng, để 2 giờ ở nhiệt độ phòng, sau đó bảo quản ở 5°C) và 5-A1 (sau pha loãng để 5 giờ ở nhiệt độ phòng sau đó bảo quản ở 5°C) có hoạt lực thấp nhất (P < 0,05). Tinh dịch được bảo quản ở 17°C có hoạt lực tinh trùng cao hơn (P < 0,05) so tinh dịch được bảo quản ở 5°C qua các ngày kiểm tra (ngoại trừ mẫu số 5-A4 không

có sự sai khác (P > 0,05). Trong nghiên cứu này, duy nhất mẫu hạ nhiệt chậm (5-A4) có thể đáp ứng được yêu cầu về hoạt lực tinh trùng đến ngày thứ ba (72 giờ), còn lại sau 120 giờ, hoạt lực tinh trùng giảm thấp hơn so với yêu cầu trên (60,50 ± 4,18%). Kết quả phân tích phương sai hai nhân tố cho thấy không có sự tương tác giữa nhiệt độ bảo quản và thời gian bảo quản đến hoạt lực tinh trùng (P > 0,05). Quá trình hạ nhiệt không chỉ ảnh hưởng đến hoạt lực tinh trùng mà còn ảnh hưởng đến tính thẩm thấu của màng, trao đổi canxi (Schmid & cs., 2013a). Nhiệt độ thấp còn làm giảm chức năng của ty thể, dẫn đến giảm nồng độ của ATP làm thay đổi quá trình trao đổi chất, hệ quả là giảm hoạt lực của tinh trùng (Nguyen & cs., 2016; Nesci & cs., 2020). Những ảnh hưởng tiêu cực của quá trình làm lạnh tinh trùng lợn cũng đã được nghiên cứu và nguyên nhân được cho là do quá trình làm lạnh đã ảnh hưởng tới sự phân bố và sắp xếp của các thành phần bên trong màng, kết quả là thay đổi tính chất của màng tế bào (Pursel & cs., 1973; De Leeuw & cs., 1990; Drobnis & cs., 1993). Cụ thể hơn là sự thay đổi tính chất của lớp phospholipid và tính thẩm thấu của màng khi hạ nhiệt độ (Buhr & cs., 1989; Schmid & cs., 2013a). Hoạt lực tinh trùng và tính nguyên vẹn của màng bị giảm đáng kể khi hạ nhiệt độ quá nhanh nên tinh dịch lợn thường được bảo quản ở 17°C.

Hoạt lực tinh trùng là chỉ tiêu quan trọng của chất lượng tinh dịch. Tuy nhiên, chỉ có hoạt lực thì không đảm bảo cho quá trình thụ tinh.

Tinh trùng cũng cần màng acrosome nguyên vẹn cho quá trình xâm nhập vượt qua các hàng rào xung quanh trứng. Nếu màng acrosome không nguyên vẹn sẽ ảnh hưởng lớn đến quá trình thụ tinh đặc biệt là phản ứng acrosome. Thời gian bảo quản không chỉ ảnh hưởng đến hoạt lực của tinh trùng mà còn ảnh hưởng đến tính nguyên vẹn của màng acrosome của mẫu tinh dịch bảo quản ở 17°C. Kết quả ở bảng 3 cho thấy, tỷ lệ tinh trùng có màng acrosome không nguyên vẹn tăng lên qua các ngày bảo quản ($P < 0,05$) đặc biệt sau 120 giờ thì tỷ lệ này tăng đáng kể so với tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau 24 giờ $3,97 \pm 1,07\%$ so với $5,19 \pm 1,07\%$. Tuy nhiên, ngày bảo quản không ảnh hưởng đến tính nguyên vẹn của màng acrosome ở các mẫu tinh bảo quản ở 5°C ($P < 0,05$). Không có sự tương tác giữa thời gian bảo quản và nhiệt độ bảo quản đến hình thái acrosome ($P > 0,05$). So sánh với mẫu bảo quản ở 17°C, thì mẫu bảo quản ở 5°C có tốc độ hạ nhiệt thấp nhất (5-A4) không có sự sai khác ($P > 0,05$), các mẫu có tốc độ hạ nhiệt cao hơn là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$). Số tinh trùng có màng acrosome không bình thường trong tinh nguyên chủ yếu là các tinh trùng có màng ngoài acrosome bị biến dạng, màng acrosome mọc lệch mất cân đối hoặc màng acrosome quá nhỏ. Sau các ngày bảo quản, tỷ lệ kỳ hình của acrosome tăng lên chủ yếu do trong quá trình bảo quản trong môi trường nhân tạo làm màng acrosome bị bong ra hoặc mất đi. Đặc biệt cách hạ nhiệt chậm (5-A4) được xem là tối ưu nhất. Điều này có thể được giải thích do cách hạ nhiệt chậm cũng đã làm giảm sự tổn thương của màng acrosome do quá trình hạ nhiệt mang lại.

Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình có sự khác biệt rõ rệt ($P < 0,05$) giữa các mẫu bảo quản ở 5°C và 17°C (ngoại trừ mẫu có tốc độ hạ nhiệt thấp nhất 5-A4) trong các phần của hình thái tinh trùng: đầu, cổ và phần đuôi tinh trùng (Bảng 4, Bảng 5, Bảng 6). Tinh trùng kỳ hình ở phần đầu thấp nhất ở 17°C chiếm khoảng 2,87%-3,85% qua các ngày bảo quản, cao nhất ở mẫu có tốc độ hạ nhiệt nhanh (5-A0), không có sự sai khác giữa mẫu bảo quản ở 17°C và mẫu bảo quản ở 5°C có tốc độ hạ nhiệt thấp nhất ($P < 0,05$). Xu hướng tương tự cũng xảy ra ở tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở phần cổ và đuôi. Ngành thụ tinh nhân

tạo của Đức đã đưa ra yêu cầu về hình thái của tinh trùng. Theo đó tổng số tinh trùng kỳ hình nhỏ hơn 25%, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở đầu và acrosome chiếm tỷ lệ lần lượt là 5% và 10%, tỷ lệ tinh trùng có bong nguyên sinh chất và tinh trùng đuôi vòng đòi hỏi thấp hơn 15% (Weitze, 2011). Đối chiếu với những yêu cầu trên thì tinh dịch của giống lợn Duroc trong nghiên cứu này đảm bảo tiêu chuẩn cho thụ tinh nhân tạo. Thực nghiệm đã cho thấy có sự tương quan giữa hình thái tinh trùng bị biến đổi và khả năng thụ tinh. Có mối quan hệ ngược chiều giữa tỷ lệ tinh trùng có bong nguyên sinh chất ở xa và tỷ lệ thụ tinh: những bong nguyên sinh chất ở xa ít có hại hơn những bong nguyên sinh chất ở gần (Johnson & cs., 2000). Tốc độ hạ nhiệt có ảnh hưởng lớn đến hình thái tinh trùng sau bảo quản ở tất cả các phần của tinh trùng. Điều này cũng phù hợp với các dẫn chứng liên quan đến màng tế bào tinh trùng cũng như sự đáp ứng của màng trước sự thay đổi về nhiệt độ. Không có sự sai khác về tỷ lệ tinh trùng kỳ hình quy các ngày bảo quản ở nhiệt độ thấp. Có thể do sự tác động của nhiệt độ đến tế bào tinh trùng ngay lập tức sau khi bảo quản ở nhiệt độ thấp nên tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau 24 giờ cao hơn ($P < 0,05$) so với mẫu bảo quản ở 17°C (ngoại trừ mẫu 5-A4, cách hạ nhiệt chậm nên không có sự sai khác, $P > 0,05$). Kết quả phân tích phương sai hai nhân tố cho thấy không có sự tương tác giữa nhiệt độ bảo quản và thời gian bảo quản đến tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở phần đầu ($P > 0,05$) nhưng có ảnh hưởng tới tỷ lệ kỳ hình ở phần thân và đuôi tinh trùng ($P < 0,05$).

Quá trình hạ nhiệt độ quá nhanh (5-A0) đã làm giảm hoạt lực tinh trùng cũng như hình thái tinh trùng, đặc biệt là ở màng acrosome sau 24 giờ cho thấy sự đáp ứng với stress nhiệt độ thấp khác nhau ở tinh trùng lợn. Do đó quá trình làm lạnh từ từ và giữ ở nhiệt độ phòng trong một thời gian nhất định được khuyến cáo khi bảo quản tinh dịch lợn ở 17°C (Schulze & cs., 2013). Điều này cũng phù hợp với quá trình hạ nhiệt trong nghiên cứu này đối với mẫu ở 17°C. Trong các mẫu bảo quản ở 5°C, các mẫu 5-A3 và 5-A4 có cách hạ nhiệt từ từ cũng phù hợp với khuyến cáo trên.

Bảng 3. Tỷ lệ tinh trùng tổn thương màng acrosome qua các ngày bảo quản ở 17°C và các mức hạ nhiệt khác nhau trước khi bảo quản ở 5°C

Mức hạ nhiệt và nhiệt độ bảo quản	Tỷ lệ tổn thương sau các mốc thời gian bảo quản (n = 30, $\bar{X} \pm SD$) (%)			
	24h	48h	72h	120h
17°C	3,97 ^{aA} ± 1,27	4,30 ^{abA} ± 1,14	4,89 ^{bcA} ± 1,50	5,19 ^{cA} ± 1,07
5-A0	7,84 ^B ± 2,22	8,08 ^B ± 2,18	8,43 ^B ± 2,18	8,73 ^B ± 2,18
5-A1	7,44 ^B ± 2,04	7,57 ^B ± 1,79	7,46 ^B ± 1,75	7,66 ^{BC} ± 1,75
5-A2	7,14 ^B ± 2,22	7,35 ^B ± 1,90	7,44 ^B ± 1,78	7,65 ^{BC} ± 1,79
5-A3	6,99 ^B ± 2,28	7,07 ^B ± 1,93	7,18 ^B ± 1,90	7,38 ^C ± 1,90
5-A4	5,20 ^A ± 1,17	5,19 ^A ± 1,07	5,83 ^A ± 1,16	6,03 ^A ± 1,16

Ghi chú: Các chữ cái in thường khác nhau trong cùng một dòng (a-c) cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê qua các ngày bảo quản ($P < 0,05$); Các chữ cái in hoa khác nhau trong cùng một cột (A-C) cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu bảo quản ở 17°C và các mức hạ nhiệt khác nhau ($P < 0,05$).

Bảng 4. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở phần đầu qua các ngày bảo quản ở 17°C và các mức hạ nhiệt khác nhau trước khi bảo quản ở 5°C

Mức hạ nhiệt và nhiệt độ bảo quản	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau các mốc thời gian bảo quản (n = 30, $\bar{X} \pm SD$) (%)			
	24h	48h	72h	120h
17°C	2,87 ^{aA} ± 0,73	3,32 ^{abA} ± 0,81	3,67 ^{bA} ± 0,85	3,85 ^{bA} ± 0,83
5-A0	5,12 ^{abB} ± 0,91	5,39 ^{abB} ± 0,89	5,59 ^{abB} ± 0,89	5,89 ^{bbB} ± 0,89
5-A1	4,45 ^{abB} ± 0,70	4,89 ^{abB} ± 0,69	5,19 ^{bbB} ± 0,69	5,39 ^{cbB} ± 0,69
5-A2	4,18 ^{abB} ± 0,85	4,10 ^{acB} ± 0,74	4,40 ^{acB} ± 0,75	4,67 ^{bcB} ± 0,78
5-A3	3,70 ^{bcB} ± 0,74	3,89 ^{acB} ± 0,75	4,10 ^{acB} ± 0,76	4,20 ^{acB} ± 0,76
5-A4	3,33 ^{aAC} ± 0,72	3,73 ^{abAC} ± 0,81	4,02 ^{bcB} ± 0,82	4,11 ^{bbB} ± 0,83

Ghi chú: Các chữ cái in thường khác nhau trong cùng một dòng (a-c) cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê qua các ngày bảo quản ($P < 0,05$); Các chữ cái in hoa khác nhau trong cùng một cột (A-C) cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu bảo quản ở 17°C và các mức hạ nhiệt khác nhau ($P < 0,05$).

Bảng 5. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở phần cổ qua các ngày bảo quản ở 17°C và các mức hạ nhiệt khác nhau trước khi bảo quản ở 5°C

Mức hạ nhiệt và nhiệt độ bảo quản	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau các mốc thời gian bảo quản (n = 30, $\bar{X} \pm SD$) (%)			
	24h	48h	72h	120h
17°C	2,90 ^{aA} ± 0,92	3,45 ^{aA} ± 0,74	3,95 ^{bca} ± 0,74	4,05 ^{cA} ± 0,71
5-A0	4,90 ^B ± 0,32	5,00 ^B ± 0,91	5,40 ^B ± 0,91	5,44 ^B ± 0,97
5-A1	4,61 ^{abC} ± 0,90	4,81 ^{abBC} ± 0,94	5,21 ^{abBC} ± 0,94	5,25 ^{bbC} ± 0,93
5-A2	4,40 ^{abC} ± 0,71	4,77 ^{abBC} ± 0,86	5,17 ^{bbC} ± 0,86	5,30 ^{bbC} ± 0,89
5-A3	4,10 ^{acC} ± 0,55	4,38 ^{abC} ± 0,94	4,78 ^{bcC} ± 0,94	4,81 ^{bcC} ± 0,91
5-A4	3,21 ^A ± 0,89	3,40 ^A ± 0,85	3,66 ^A ± 0,84	3,74 ^A ± 0,88

Ghi chú: Các chữ cái in thường khác nhau trong cùng một dòng (a-c) cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê qua các ngày bảo quản ($P < 0,05$); Các chữ cái in hoa khác nhau trong cùng một cột (A-C) cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu bảo quản ở 17°C và các mức hạ nhiệt khác nhau ($P < 0,05$).

Bảng 6. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình ở phần đuôi qua các ngày bảo quản ở 17°C và các mức hạ nhiệt khác nhau trước khi bảo quản ở 5°C

Mức hạ nhiệt và nhiệt độ bảo quản	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau các mốc thời gian bảo quản (n = 30, $\bar{X} \pm SD$) (%)			
	24h	48h	72h	120h
17°C	3,37 ^{aA} ± 0,71	3,55 ^{abA} ± 0,72	3,66 ^{abA} ± 0,70	3,85 ^{ba} ± 0,38
5-A0	5,87 ^B ± 0,89	5,99 ^B ± 0,51	6,01 ^B ± 0,84	6,24 ^B ± 0,81
5-A1	5,57 ^B ± 0,65	5,59 ^B ± 0,76	5,51 ^{BC} ± 0,90	5,70 ^{BC} ± 0,89
5-A2	5,37 ^{BC} ± 0,85	5,54 ^{BC} ± 0,32	5,63 ^{BC} ± 0,74	5,78 ^{BC} ± 0,73
5-A3	4,87 ^C ± 0,79	5,04 ^C ± 0,20	5,12 ^C ± 0,68	5,27 ^C ± 0,69
5-A4	3,87 ^A ± 0,82	3,95 ^D ± 0,70	4,08 ^A ± 0,69	4,21 ^A ± 0,70

Ghi chú: Các chữ cái in thường khác nhau trong cùng một dòng (a-c) cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê qua các ngày bảo quản ($P < 0,05$); Các chữ cái in hoa khác nhau trong cùng một cột (A-D) cho biết sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các mẫu bảo quản ở 17°C và các mức hạ nhiệt khác nhau ($P < 0,05$).

Cho thấy rằng tinh trùng lợn sau khi xuất tinh bị giảm nhiệt độ rất nhanh từ nhiệt độ thân nhiệt xuống nhiệt độ khoảng 18°C, kết quả là tăng mạnh số tinh trùng không vận động, đặc biệt khi nhiệt độ tiếp tục giảm tiếp xuống 3-4°C. Quá trình hạ nhanh nhiệt độ từ 35°C xuống 18°C sau khi pha loãng tinh dịch là nguyên nhân chính dẫn đến giảm đáng kể hoạt lực tinh trùng. Tinh trùng được trộn lẫn với tinh thanh của các tuyến sinh dục phụ trong quá trình xuất tinh và hoạt lực của chúng được duy trì trong vài giờ. Quá trình chuyển tinh trùng từ tinh dịch sang môi trường nhân tạo cho thấy giảm hoạt lực và tăng sự kết dính giữa các tinh trùng, điều đó cho thấy tinh thanh có vai trò quan trọng trong việc bảo vệ màng và duy trì khả năng thụ tinh trong quá trình bảo quản (Harrison & cs., 1978). Do vậy, việc nghiên cứu và cải tiến các thành phần của môi trường nhân tạo cũng như nhiệt độ bảo quản là điều hết sức cần thiết để giảm thiểu sự tác động đến tinh trùng.

4. KẾT LUẬN

Phương pháp hạ nhiệt và cách bảo quản có ảnh hưởng rõ rệt đến chất lượng tinh trùng khi bảo quản ở nhiệt độ thấp. Nghiên cứu này đã chỉ ra tốc độ hạ nhiệt chậm có kết quả tốt hơn so với quá trình hạ nhiệt nhanh. Cụ thể, cách hạ nhiệt chậm 5-A4 (2 giờ ở nhiệt độ phòng, 3 giờ ở 10°C) có chất lượng tinh dịch không sai khác so với mẫu tinh dịch bảo quản ở 17°C; cách hạ nhiệt nhanh 5-A0 (sau pha loãng bảo quản ngay

ở 5°C) đã làm giảm đáng kể chất lượng tinh dịch. Các mẫu tinh dịch của các phương pháp hạ nhiệt cũng cần được dùng để phối giống thử nghiệm thông qua các chỉ tiêu tỷ lệ có chửa, số con sơ sinh sống/lúa... để có thể đánh giá chính xác hơn kết quả nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn dự án Việt - Bỉ (ARES-CCD) đã hỗ trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Auroux M.R., Jacques L., Mathieu D. & Auer J. (1991). Is the sperm bacterial ratio a determining factor in impairment of sperm motility: an *in vitro* study in man with *Escherichia coli*. International Journal of Andrology. 14(4): 264-270.
- Bộ Khoa học và Công nghệ (2011). Tiêu chuẩn quốc gia TCVN 9111:2011 về Lợn giống ngoại - Yêu cầu kỹ thuật.
- Buhr M.M., Canvin A.T. & Bailey J.L. (1989). Effects of semen preservation on boar spermatozoa head membranes. Gamete Res. 23(4): 441-9.
- De Leeuw F.E., Chen H.C., Colenbrander B. & Verkleij A.J. (1990). Cold-induced ultrastructural changes in bull and boar sperm plasma membranes. Cryobiology. 27(2): 171-83.
- Drobnis E.Z., Crowe L.M., Berger T., Anchordoguy T.J., Overstreet J.W. & Crowe J.H. (1993). Cold shock damage is due to lipid phase transitions in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. J Exp Zool. 265(4): 432-7.

- El-Mulla K.F., Köhn F.M., Dandal M., El Beheiry A.H., Schiefer H.G., Weidner W. & Schill W.B. (1996). In vitro effect of *Escherichia coli* on human sperm acrosome reaction. *Arch Androl.* 37(2): 73-8.
- Hà Xuân Bộ, Đỗ Đức Lực & Đặng Vũ Bình (2011). Đánh giá phẩm chất tinh dịch lợn Piétrain kháng stress nhập từ Bỉ nuôi tại Xí nghiệp Chăn nuôi Đồng Hiệp - Hải Phòng. *Tạp chí Khoa học và Phát triển.* 9(5): 7.
- Hà Xuân Bộ, Đỗ Đức Lực, Bùi Văn Định, Bùi Hữu Đoàn, Vũ Đình Tôn & Đặng Vũ Bình (2013). Khả năng sinh trưởng và phẩm chất tinh dịch lợn đực Piétrain kháng stress nuôi tại Trung tâm Giống lợn chất lượng cao - Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội. *Tạp chí Khoa học và Phát triển.* 11(2): 6.
- Harrison R.A., Dott H.M. & Foster G.C. (1978). Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium. *J Reprod Fertil.* 52(1): 65-73.
- Johnson L.A., Weitze K.F., Fiser P. & Maxwell W.M. (2000). Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci.* 62(1-3): 143-72.
- Martín L.O., Muñoz E.C., De Cupere F., Van Driessche E., Echemendia-Blanco D., Rodríguez J.M. & Beeckmans S. (2010). Bacterial contamination of boar semen affects the litter size. *Anim Reprod Sci.* 120(1-4): 95-104.
- Nesci S., Spinaci M., Galeati G., Nerozzi C., Pagliarani A., Algieri C., Tamanini C. & Bucci D. (2020). Sperm function and mitochondrial activity: An insight on boar sperm metabolism. *Theriogenology.* 144: 82-88.
- Nguyen Q.T., Wallner U., Schmicke M., Waberski D. & Henning H. (2016). Energy metabolic state in hypothermically stored boar spermatozoa using a revised protocol for efficient ATP extraction. *Biology Open.* 10.1242/bio.017954.
- Paulenz H., Grevle I., Tverdal A., Hofmo P. & Berg K.A. (1995). Precision of the Coulter® Counter for Routine Assessment of Boar-sperm Concentration in Comparison with the Haemocytometer and Spectrophotometer. *Reproduction in Domestic Animals.* 30(3): 107-111.
- Payne B.J., Clark S. & Maddox C. (2008). *Achromobacter xylosoxidans* in extended semen causes reproductive failure in artificially inseminated sows and gilts. *Journal of Swine Health and Production.* 16(6): 316-322.
- Pursel V.G., Schulman L.L. & Johnson L.A. (1973). Effect of holding time on storage of boar spermatozoa at 5°C. *J Anim Sci.* 37(3): 785-9.
- Schmid S., Henning H., Oldenhof H., Wolkers W.F., Petrunkina A.M. & Waberski D. (2013a). The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermically stored boar spermatozoa. *Andrology.* 1(3): 376-86.
- Schmid S., Henning H., Petrunkina A. M., Weitze K.F. & Waberski D. (2013b). Response to capacitating stimuli indicates extender-related differences in boar sperm function. *J Anim Sci.* 91(10): 5018-25.
- Schulze M., Grobbel M., Riesenbeck A., Brüning S., Schaefer J., Jung M. & Grossfeld R. (2017). Dose rates of antimicrobial substances in boar semen preservation time to establish new protocols. *Reproduction in Domestic Animals.* 52(3): 397-402.
- Schulze M., Henning H., Rüdiger K., Wallner U. & Waberski D. (2013). Temperature management during semen processing: Impact on boar sperm quality under laboratory and field conditions. *Theriogenology.* 80(9): 990-998.
- Sepúlveda L., Bussalleu E., Yeste M. & Bonet S. (2014). Effects of different concentrations of *Pseudomonas aeruginosa* on boar sperm quality. *Anim Reprod Sci.* 150(3-4): 96-106.
- Speck S., Courtiol A., Junkes C., Dathe M., Müller K. & Schulze M. (2014). Cationic synthetic peptides: assessment of their antimicrobial potency in liquid preserved boar semen. *PLoS One.* 9(8): e105949-e105949.
- Ubeda J.L., Ausejo R., Dahmani Y., Falceto M.V., Usan A., Malo C. & Perez-Martinez F.C. (2013). Adverse effects of members of the Enterobacteriaceae family on boar sperm quality. *Theriogenology.* 80(6): 565-70.
- Waberski D., Henning H. & Petrunkina A. (2011). Assessment of storage effects in liquid preserved boar semen. *Reproduction in Domestic Animals.* 46(s2): 45-48.
- Waberski D., Luther A.M., Grünther B., Jäkel H., Henning H., Vogel C., Peralta W. & Weitze K.F. (2019a). Sperm function *in vitro* and fertility after antibiotic-free, hypothermic storage of liquid preserved boar semen. *Scientific Reports.* 9(1): 14748.
- Waberski D., Riesenbeck A., Schulze M., Weitze K. F. & Johnson L. (2019b). Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology.* 137: 2-7.
- Weitze K.F. (2011). The importance of boar sperm motility and morphology for fertility, *International Pig Topics,* 27(5): 13-15.
- Wolff H., Panhans A., Stolz W. & Meurer M. (1993). Adherence of *Escherichia coli* to sperm: a mannose mediated phenomenon leading to agglutination of sperm and *E. coli*. *Fertil Steril.* 60(1): 154-8.
- Yeste M. (2015). Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and Current Perspectives. *Reprod Domest Anim.* 50(Suppl 2): 71-9.