

## NGHIÊN CỨU ĐÔNG LẠNH TINH DỊCH CHÓ BẮC HÀ Ở NITƠ LỎNG -196°C

Đỗ Văn Thu\*, Đoàn Việt Bình, Trần Xuân Khôi, Lê Thị Huệ

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

**TÓM TẮT:** Chó Bắc Hà là giống chó bản địa sống ở vùng Bắc Hà tỉnh Lào Cai, chúng có nhiều đặc tính tốt để huấn luyện thành chó nghiệp vụ. Tuy nhiên, hiện nay do việc nhân giống tự phát và quản lý không chặt chẽ, chó Bắc Hà đang bị lai tạp khá nhiều, mất dần những đặc tính quý. Nghiên cứu đông lạnh tinh dịch chó Bắc Hà là một giải pháp hiệu quả để bảo tồn nguồn gene quý và phát triển đàn chó. Trong thí nghiệm đã lấy 50 mẫu tinh dịch từ 6 chó đực giống Bắc Hà đang phối giống tự nhiên tại Cục Cảnh sát quản lý huấn luyện và sử dụng động vật nghiệp vụ (K204), Bộ Công an. Những mẫu tinh dịch có hoạt lực tinh trùng cao hơn 70%, tỷ lệ tinh trùng sống cao hơn 85%, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình thấp hơn 20% được dùng trong các thí nghiệm đông lạnh. Chất lượng tinh trùng sau đông lạnh được đánh giá thông qua các chỉ tiêu: hoạt lực tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng sống, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình. Các yếu tố ảnh hưởng lên chất lượng tinh sau đông lạnh được khảo sát trong thí nghiệm: ảnh hưởng của môi trường đông lạnh; ảnh hưởng của chất bảo vệ lạnh glycerol và ethylene glycol; ảnh hưởng của thời gian ủ tinh pha loãng trước khi đông lạnh; ảnh hưởng của nhiệt độ đông lạnh. Kết quả cho thấy: tinh dịch đông lạnh ở môi trường đông lạnh 1 (MTĐL1) cho hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh (41,01%) cao hơn so với tinh dịch đông lạnh ở MTĐL2 (34,17%) ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ tinh trùng sống sau đông lạnh ở MTĐL1 (66,95%) cao hơn so với MTĐL2 (57,93%) ( $p < 0,05$ ). Hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh trong trường hợp môi trường bổ sung glycerol (42,65%) cao hơn so với bổ sung ethylene glycol (35,15%) ( $p < 0,05$ ). Môi trường bổ sung 6,5% hoặc 7,0% glycerol có ảnh hưởng tốt lên sức sống của tinh trùng sau đông lạnh. Môi trường có glycerol ở thời điểm sau 2 giờ ủ tinh pha loãng ở 4°C cho chất lượng tinh trùng sau đông lạnh tốt. Thời gian tối thiểu ủ tinh pha loãng trước đông lạnh là 6 giờ. Thời gian ủ tinh pha loãng trước đông lạnh là 6 hoặc 8 giờ cho hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh tốt. Nhiệt độ tinh cọng rạ được hạ xuống -165°C trước khi nhúng tinh cọng rạ vào nitơ lỏng ở -196°C có ảnh hưởng tốt hơn lên phẩm chất tinh trùng sau đông lạnh so với -130°C.

*Từ khóa:* Chó Bắc Hà, đông lạnh tinh dịch, tinh cọng rạ.

### MỞ ĐẦU

Chó Bắc Hà là giống chó bản địa sống ở vùng Bắc Hà tỉnh Lào Cai. Chó Bắc Hà có ngoại hình thon gọn, lông mịn, thể chất chắc khỏe, mắt tinh, khứu giác rất phát triển, đặc biệt là khả năng thích nghi cao với điều kiện sống, chăm sóc nuôi dưỡng đơn giản. Với những đặc điểm trên, giống chó Bắc Hà rất thích hợp trong huấn luyện nghiệp vụ phát hiện các chất đặc định (ma túy, chất nổ, tìm kiếm cứu nạn, cứu hộ). Hiện nay, ở các trung tâm huấn luyện chó như Cục Cảnh sát quản lý huấn luyện và sử dụng động vật nghiệp vụ (K204), Bộ Công an; trường D24, Bộ Quốc phòng, đã huấn luyện và sử dụng chó Bắc Hà làm chó nghiệp vụ phục vụ công tác an ninh, quốc phòng. Qua khảo sát, đánh giá và huấn luyện nghiệp vụ sơ bộ ban đầu đối với giống chó Bắc Hà, cho thấy, đây là

giống chó có tính trung thành cao, thông minh, nhanh nhẹn, dễ huấn luyện, biết nghe lời chủ, và rất kỷ luật. Năm 2009, K204 đã khảo sát, nuôi dưỡng và đánh giá giống chó Bắc Hà trong huấn luyện nghiệp vụ. Năm 2010, K204 đã phối hợp với Trung tâm Nhiệt đới Việt Nga tiến hành huấn luyện nghiệp vụ phát hiện chất nổ đối với chó H'mông cộc đuôi và chó Bắc Hà. Năm 2012, K204 đã khai thác, phát triển nguồn gene chó H'mông cộc đuôi và chó Bắc Hà phục vụ công tác an ninh. Kết quả hiện nay đã xây dựng được đàn hạt nhân chó Bắc Hà với số lượng 50 con, đàn chó giống 100 con và đã huấn luyện nghiệp vụ đạt 40 con.

Tuy nhiên, hiện nay do việc nhân giống tự phát và quản lý không chặt chẽ, chó Bắc Hà đang bị lai tạp khá nhiều, mất dần những đặc tính quý. Vì vậy, việc nhân giống, phát triển và

bảo tồn giống chó Bắc Hà có ý nghĩa cấp thiết.

Công nghệ bảo tồn tinh dịch dạng đông lạnh kết hợp với thụ tinh nhân tạo chó là một giải pháp hiệu quả cho công tác bảo tồn và phát triển đàn chó Bắc Hà. Việc sử dụng phương pháp này có thể giúp việc phối giống có kiểm soát và bảo tồn được tinh dịch chó qua thời gian dài giúp giữ lại những nguồn gene của những cá thể thuần chủng. Ở chó, thụ tinh nhân tạo thành công đầu tiên bằng tinh đông lạnh được Seager (1969). Kể từ đó nhiều nhà nghiên cứu đã nghiên cứu kỹ thuật đông lạnh và môi trường (Dobrinski et al., 1993; Gill et al., 1970; Hay et al., 1997). Cardoso et al. (2003) đã đông lạnh tinh dịch chó sử dụng nước dừa và lòng đỏ trứng gà với 3 nồng độ glycerol là 4%, 6%, 8%, hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh ở 4%, 6% glycerol cao hơn có ý nghĩa so với 8% glycerol. Rota et al. (2006); Bessa et al. (2006) so sánh ảnh hưởng của glycerol và ethylene glycol đối với đông lạnh tinh dịch chó. Hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh cao hơn ở môi trường có ethylene glycol so với glycerol. Yildiz et al. (2000) nghiên cứu ảnh hưởng của đường trong môi trường đến hoạt lực, sức sống và sự nguyên vẹn acrosom trong quá trình đông lạnh tinh chó. Peña & Forsberg (2000) nghiên cứu ảnh hưởng của phương pháp pha loãng môi trường (một lần, hai lần) và tốc độ đông lạnh, giải đông lên khả năng sống sót của tinh trùng chó sau đông lạnh. Nöthling & Shuttleworth (2005) nghiên cứu ảnh hưởng của kích thước cọng rạ và tốc độ đông lạnh, giải đông lên chất lượng tinh chó sau đông lạnh giải đông. Somi et al. (2006) nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường và kỹ thuật pha loãng, đông lạnh tinh dịch lên hoạt lực và sức sống tinh dịch chó sau đông lạnh. Hermansson & Forsberg (2006) nghiên cứu bảo quản đông lạnh tinh trùng chó đã làm lạnh. Álamo et al. (2005) nghiên cứu bảo quản lạnh tinh dịch chó. DelosReyes (2006) thụ tinh ống nghiệm đối với noãn chín tự nhiên sử dụng tinh chó sau đông lạnh. Silva et al. (2006) nghiên cứu so sánh phương pháp bổ sung glycerol một lần với nhiều lần.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tập trung nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố lên chất lượng tinh trùng chó Bắc Hà sau đông lạnh: ảnh hưởng của môi trường đông lạnh; ảnh

hưởng của glycerol và ethylene glycol; ảnh hưởng của nồng độ glycerol; ảnh hưởng của thời điểm bổ sung môi trường có glycerol; ảnh hưởng của thời gian ủ tinh dịch trước đông lạnh; ảnh hưởng của nhiệt độ đông lạnh.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sáu chó đực giống Bắc Hà có tuổi từ 2-4 năm, khối lượng 20-30kg, đã phối giống thành thực được sử dụng làm động vật cho tinh dịch. Chó được nuôi tại Cục Cảnh sát quản lý huấn luyện và sử dụng động vật nghiệp vụ (K204) - Bộ Công an. Chó đực đảm bảo tiêu chuẩn đực giống theo tiêu chuẩn của K204, chó được chăm sóc theo quy trình và khẩu phần dinh dưỡng của K204. Những mẫu tinh dịch có hoạt lực tinh trùng cao hơn 70%, tỷ lệ tinh trùng sống cao hơn 85%, tỷ lệ tinh trùng kỳ hình thấp hơn 20% được sử dụng trong các thí nghiệm đông lạnh. Tổng số 10 lần khai thác tinh dịch ở mỗi chó được thu nhận trong quá trình thí nghiệm. Tổng số mẫu tinh dịch đủ tiêu chuẩn để thí nghiệm là 50 mẫu.

Thành phần của môi trường đông lạnh:

Môi trường 1: Tris 3,634g, Citric acid 1,99g, fructose 0,5g, lòng đỏ trứng gà 14ml, penicillin 100mg, streptomycin 100mg, nước cất hai lần đủ 100ml.

Môi trường 2: Tris 1,3625g, Citric acid 0,7615g, fructose 0,375g, lactose 1,5g, raffinose 2,7g, lòng đỏ trứng gà 20 ml, penicillin 100mg, streptomycin 100 mg, nước cất hai lần đủ 100 ml.

Chất bảo vệ lạnh bổ sung vào môi trường là Glycerol hoặc Ethylene glycol.

**Phương pháp thu nhận tinh dịch:** Tinh dịch chó được thu nhận bằng phương pháp massages theo Kutzler (2005): dùng tay kích thích ở phần tự do của quy đầu cho đến khi xuất ra chất dịch trong, đó là pha thứ nhất của quá trình xuất tinh. Khi chó đực bắt đầu đập mạnh để chuẩn bị xuất tinh ở pha thứ hai thì thôi không kích thích nữa mà phải bóp chặt, tạo một áp lực mạnh ở tuyến hành dương vật để xuất toàn bộ tinh dịch của pha này. Khi kết thúc pha thứ hai thì chuyển sang kích thích ở phần gốc dương vật bằng lực trượt cho đến khi xuất tinh

thanh của pha thứ ba, lúc này phải tạo được một vòng áp lực mạnh giống như cổ tử cung bằng cách bóp chặt hai ngón tay cái và ngón trỏ để cho nó phóng hết tinh thanh của pha ba và pha bốn.

Người giúp việc dùng lọ hứng tinh tách riêng phần tinh dịch của pha thứ hai là pha chứa nhiều tinh trùng. Tinh dịch sau khi thu nhận được, nhanh chóng bảo quản ở nhiệt độ mát (5-10°C). Lấy tinh vào buổi sáng. Khoảng thời gian giữa hai lần lấy tinh là 3 ngày

**Phương pháp kiểm tra hoạt lực tinh trùng:**

Theo phong pháp của Milovanov (1926) và Chemineau (1991): Dùng đĩa thủy tinh sạch lấy một giọt tinh dịch lên phiến kính sạch, ấm (30-35°C). Dùng một lá kính khô, sạch đặt lên giọt tinh dịch sao cho giọt tinh dịch được dàn đều và không lẫn bọt khí. Đặt tiêu bản lên kính hiển vi (Olympus) và xem với độ phóng đại 100-400 lần. Trong khi kiểm tra, tiêu bản được soi ấm ở 37-38°C.

**Phương pháp kiểm tra tỷ lệ tinh trùng kỳ hình:**

Theo phong pháp của William (1921) kết hợp với Chemineau (1991): Phết một lớp mỏng, dàn đều tinh dịch lên phiến kính, hong khô tiêu bản trong không khí. Nhuộm màu tinh trùng, nhuộm đơn trong vòng 5-10 phút với thuốc nhuộm hỗn hợp Eosin và Nigrosin. Rửa tiêu bản bằng sức loang của giọt nước cất, hong khô. Quan sát bằng kính hiển vi Olympus với độ phóng đại 400-1.000 lần. Đếm ngẫu nhiên, đếm lần lượt 300-500 tinh trùng bất kỳ, cả tinh trùng bình thường lẫn tinh trùng kỳ hình.

**Phương pháp kiểm tra tỷ lệ tinh trùng sống:**

Theo phương pháp của Chemineau (1991): Dung dịch nhuộm: Eosin 1g, Nigrosin 2g, Natri-citrate 3,57 g, nước cất 2 lần: 100ml. pH dung dịch nhuộm 6,7-6,8, áp suất thẩm thấu 310 miliosmol/kg. Tiến hành: Dùng phiến kính sạch và để ấm ở nhiệt độ 30°C. Nhỏ 3 giọt dung dịch nhuộm (tương đương 30µl) lên một đầu của phiến kính. Thêm một giọt tinh dịch và trộn đều với dung dịch nhuộm trong vòng 10 giây. Sau khi pha trộn để 50 giây. Dùng phiến kính thứ hai nhẹ nhàng san đều hỗn hợp đã nhuộm. Đếm tổng số không dưới 300 tinh trùng, đều ở các vùng, tinh trùng sống không bắt màu.

**Phương pháp đông lạnh tinh dịch:** Pha

môi trường đông lạnh (phần A, không có glycerol) vào tinh dịch đủ chất lượng. Ủ tinh dịch pha loãng ở 4°C trong 2 giờ. In cọng rạ: Đưa cọng rạ vào máy in, các thông số được in trên cọng rạ gồm: giống, số hiệu, ngày sản xuất tinh, nơi sản xuất. Ủ cọng rạ đã in ở 4°C. Bổ sung môi trường B (có glycerol hoặc Ethylene glycol) vào tinh pha loãng và tiếp tục ủ thêm 2 giờ. Nạp tinh pha loãng đã được ủ ở 4°C với thời gian 04 giờ vào cọng rạ: Đưa cọng rạ đã được in số liệu vào máy, sau đó đưa tinh pha loãng của những con có số hiệu tương ứng với cọng rạ lên máy lắc từ và để máy tự động nạp tinh vào cọng rạ. Sau khi nạp tinh, các cọng rạ được xếp vào khay và đưa ngay vào tủ cân bằng ở 4°C và tiếp tục ủ trong thời gian 02 giờ. Đông lạnh tinh cọng rạ, nhiệt độ trong buồng đông lạnh hạ xuống -130°C hoặc -165°C. Thả tinh cọng rạ ở -130°C hoặc -165°C vào nitơ lỏng -196°C.

**Phương pháp giải đông tinh cọng rạ:** Tinh cọng rạ lấy ra khỏi nitơ lỏng và nhúng ngập vào nước ấm 37°C trong 30-60 giây, lau khô nước phía ngoài cọng rạ, cắt đầu cọng rạ sau đó cho hỗn hợp tinh dịch vào ống nghiệm.

Các số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học với phần mềm Minitab 16.0, kiểm định sự khác biệt T-test.

Các thí nghiệm được tiến hành:

So sánh ảnh hưởng của 02 môi trường lên chất lượng tinh đông lạnh: Môi trường 1 bổ sung 6,5% glycerol; môi trường 2 bổ sung 6,5% glycerol.

So sánh ảnh hưởng của glycerol và ethylene glycol lên chất lượng tinh đông lạnh: Môi trường 1 bổ sung glycerol 6,5%; môi trường 1 bổ sung ethylene glycol 6,5%.

So sánh ảnh hưởng của nồng độ glycerol lên chất lượng tinh đông lạnh: Môi trường 1 bổ sung glycerol với các nồng độ 4,0%, 6,5%, 7,0%, 8,0% và 10,0%.

So sánh ảnh hưởng của thời điểm bổ sung phần môi trường có glycerol lên chất lượng tinh đông lạnh: bổ sung môi trường có glycerol ở các thời điểm: 0 giờ, 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ và 4 giờ sau ủ tinh.

So sánh ảnh hưởng của thời gian ủ tinh dịch ở 4°C trước đông lạnh lên phẩm chất tinh đông

lạnh: thời gian ủ tinh dịch 2 giờ, 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ và 10 giờ.

So sánh ảnh hưởng của nhiệt độ đông lạnh lên chất lượng tinh đông lạnh: tinh cọng rạ được hạ nhiệt độ xuống  $-130^{\circ}\text{C}$  hoặc  $-165^{\circ}\text{C}$  trước khi

nhúng vào ni tơ lỏng.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Ảnh hưởng của môi trường đông lạnh lên chất lượng tinh đông lạnh

Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường đông lạnh lên chất lượng tinh đông lạnh

Môi trường đông lạnh	Hoạt lực tinh trùng (%)		Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)		Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	
	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh
	MTĐL1	74,94 $\pm 4,07^a$	41,01 $\pm 3,05^a$	17,24 $\pm 2,16^a$	21,85 $\pm 2,63^a$	84,85 $\pm 3,36^a$
MTĐL2	72,83 $\pm 3,93^a$	34,17 $\pm 2,39^b$	19,13 $\pm 3,59^a$	22,31 $\pm 2,89^a$	82,05 $\pm 3,84^a$	57,93 $\pm 3,54^b$

Đối với từng chỉ tiêu, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ( $p < 0,05$ .)



Hình 1. Tinh trùng kỳ hình phần cổ (01)



Hình 2. Tinh trùng chết bắt màu đỏ

Hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh ở MTĐL1 (41,01%) cao hơn so với ở MTĐL2 (34,17%) ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ tinh trùng sống sau đông lạnh ở MTĐL1 (66,95%) cao hơn so với MTĐL2 (57,93%) ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau đông lạnh ở MTĐL1 (21,85%) không có sự khác nhau về thống kê so với MTĐL2 (22,31%). Somi et al. (2006) đã sử dụng môi trường có thành phần cơ bản là Tris- lòng đỏ trứng để đông lạnh tinh dịch chó, hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh đạt 53,1%, sức sống tinh

trùng đạt 64,9%. Hermansson & Forsberg (2006) đã so sánh ảnh hưởng của môi trường Uppsala Equex - 2 và môi trường Tris - lòng đỏ trứng lên hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh, cho thấy môi trường Uppsala Equex - 2 có ưu thế hơn môi trường Tris - lòng đỏ. Với kết quả nhận được, chúng tôi đã chọn MTĐL1 dùng để đông lạnh tinh dịch chó trong các thí nghiệm tiếp theo.

### Ảnh hưởng của glycerol và ethylene glycol lên chất lượng tinh đông lạnh

Bảng 2. Ảnh hưởng của glycerol và ethylene glycol lên chất lượng tinh đông lạnh

Chất bảo vệ lạnh	Hoạt lực tinh trùng (%)		Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)		Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	
	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh
Glycerol 6,5%	73,15 $\pm 3,58^a$	42,65 $\pm 3,15^a$	19,75 $\pm 2,055^a$	23,78 $\pm 2,73^a$	83,57 $\pm 3,51^a$	65,25 $\pm 3,25^a$
Ethylene glycol 6,5%	72,83 $\pm 4,26^a$	35,15 $\pm 2,47^b$	18,52 $\pm 3,15^a$	21,68 $\pm 2,19^a$	82,73 $\pm 4,57^a$	60,58 $\pm 2,54^b$

Đối với từng chỉ tiêu, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ( $p < 0,05$ .)

Hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh trong trường hợp môi trường bổ sung glycerol cao hơn so với bổ sung ethylene glycol ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình trước và sau đông lạnh khác nhau không có ý nghĩa dưới ảnh hưởng của các chất bảo vệ lạnh được bổ sung vào môi trường. Tỷ lệ tinh trùng sống trước đông lạnh trong trường hợp bổ sung glycerol cao hơn không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ) so với bổ sung ethylene glycol. Glycerol có ảnh hưởng tích cực lên tỷ lệ tinh trùng sống sau đông lạnh. Tỷ lệ tinh trùng sống sau đông lạnh cao hơn trong trường hợp môi trường có glycerol (65,25%) so với môi trường có ethylene glycol (60,58%) ( $p < 0,05$ ). Rota et al. (2006) nhận thấy, tinh dịch pha trong môi trường Tris- lòng đỏ trứng gà có chứa 5% glycerol hoặc 5% ethylene glycol, hoạt lực tinh trùng cao hơn có ý nghĩa trong môi trường đông lạnh có ethylene glycol tại thời điểm giải đông. Sau giải đông 1 giờ, ảnh hưởng của các chất bảo vệ lạnh không có ý nghĩa. Tinh

đông lạnh với ethylene glycol có tốc độ chuyển động và chuyển động thẳng cao hơn tới 3 giờ sau giải đông, tuy nhiên cũng có tốc độ chuyển động vòng và sự bất bình thường của đầu cao hơn trong môi trường có chất bảo vệ lạnh là glycerol, có thể do ethylene glycol ảnh hưởng đến các màng của tinh trùng và có thể làm giảm tuổi thọ của tinh trùng sau giải đông. Sự nguyên vẹn về chức năng của màng sinh chất tương tự với ethylene glycol và glycerol đến 3 giờ sau giải đông, sau đó các mẫu có ethylene glycol có chất lượng giảm nhanh hơn. Bessa et al. (2006) cho thấy, không có lợi thế khi sử dụng ethylene glycol thay cho glycerol khi đông lạnh tinh dịch chó hoặc kết hợp ethylene glycol với glycerol.

Với kết quả nhận được cho thấy, glycerol là chất bảo vệ lạnh có ảnh hưởng tích cực trong đông lạnh tinh dịch chó.

**Ảnh hưởng của nồng độ glycerol lên chất lượng tinh đông lạnh**

*Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ glycerol trong môi trường lên chất lượng tinh đông lạnh*

Nồng độ Glycerol (%)	Hoạt lực tinh trùng (%)		Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)		Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	
	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh
	Glycerol 4,0	70,84 ± 5,18 <sup>a</sup>	31,84 ± 3,65 <sup>a</sup>	20,54 ± 1,48 <sup>a</sup>	26,49 ± 1,42 <sup>a</sup>	81,63 ± 3,42 <sup>a</sup>
Glycerol 6,5	74,61 ± 3,52 <sup>a</sup>	40,61 ± 3,14 <sup>b</sup>	20,22 ± 2,71 <sup>a</sup>	25,46 ± 1,40 <sup>a</sup>	84,14 ± 3,05 <sup>a</sup>	61,45 ± 3,83 <sup>b</sup>
Glycerol 7,0	73,34 ± 2,88 <sup>a</sup>	39,03 ± 2,72 <sup>b</sup>	20,90 ± 2,2 <sup>a</sup>	26,01 ± 1,58 <sup>a</sup>	82,18 ± 2,63 <sup>a</sup>	62,24 ± 3,62 <sup>b</sup>
Glycerol 8,0	71,82 ± 3,85 <sup>a</sup>	37,03 ± 2,68 <sup>c</sup>	20,77 ± 2,57 <sup>a</sup>	26,03 ± 1,23 <sup>a</sup>	79,39 ± 4,11 <sup>a</sup>	57,86 ± 2,35 <sup>a</sup>
Glycerol 10,0	66,92 ± 3,82 <sup>a</sup>	27,17 ± 1,54 <sup>d</sup>	20,51 ± 1,51 <sup>a</sup>	23,96 ± 1,19 <sup>b</sup>	76,42 ± 3,84 <sup>a</sup>	45,56 ± 4,71 <sup>c</sup>

Đối với từng chỉ tiêu, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ).

Hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh trong trường hợp tinh dịch đông lạnh với môi trường có bổ sung glycerol với nồng độ 6,5%, 7,0%, 8,0% cao hơn so với môi trường bổ sung glycerol với nồng độ 4%, 10% ( $p < 0,05$ ). Môi trường đông lạnh có nồng độ glycerol 10% cho hoạt lực tinh trùng sau giải đông thấp, nhưng với nồng độ glycerol 10% có tác dụng tốt bảo vệ cấu trúc của tinh trùng trong quá trình đông

lạnh ở -196°C. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau đông lạnh đạt 23,96% trong trường hợp bổ sung 10% glycerol vào môi trường. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau đông lạnh khác nhau không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ) trong các trường hợp bổ sung glycerol với các nồng độ 4%, 6,5%, 7,0% và 8,0%. Tỷ lệ tinh trùng sống sau đông lạnh cao hơn trong môi trường bổ sung glycerol với nồng độ 6,5, 7,0% so với nồng độ 4%, 8,0% và

10,0% ( $p < 0,05$ ). Kết quả cho thấy, bổ sung glycerol vào môi trường với nồng độ 6,5% hoặc 7,0% có ảnh hưởng tốt lên sức sống của tinh trùng trong quá trình đông lạnh. Cardoso et al. (2003) cho thấy hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh đạt 49,2%, 44,2%, 35,8% với các nhóm có nồng độ glycerol tương ứng là 4,0%, 6,0%, 8,0%. Không có sự khác nhau về hoạt lực và sức sống của tinh trùng giữa các nhóm, tuy nhiên có phần trăm nhỏ hơn tổng số tinh trùng

bất thường ở cấp độ 2 thu được khi xử dụng 6,0% glycerol trong môi trường nước dừa. Yildiz et al. (2000) đã sử dụng 8,0% glycerol trong môi trường đông lạnh tinh dịch Tris-citric, hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh đạt 60%, tỷ lệ tinh trùng chết 20,6%, tỷ lệ tinh trùng bị phá hủy acrosom 44,6%.

#### **Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung phần môi trường có glycerol lên chất lượng tinh đông lạnh**

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung môi trường có glycerol lên chất lượng tinh đông lạnh

Thời điểm bổ sung glycerol	Hoạt lực		Tỷ lệ		Tỷ lệ	
	tinh trùng (%)		tinh trùng kỳ hình (%)		tinh trùng sống (%)	
	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh
0 giờ	70,37 ± 3,16 <sup>a</sup>	31,74 ± 4,63 <sup>a</sup>	18,83 ± 2,58 <sup>a</sup>	24,15 ± 2,65 <sup>a</sup>	82,52 ± 4,57 <sup>a</sup>	55,15 ± 3,47 <sup>a</sup>
1 giờ	73,68 ± 4,27 <sup>a</sup>	37,68 ± 3,48 <sup>b</sup>	20,15 ± 3,41 <sup>a</sup>	25,73 ± 3,16 <sup>a</sup>	80,87 ± 3,64 <sup>a</sup>	62,85 ± 3,65 <sup>b</sup>
2 giờ	72,26 ± 3,50 <sup>a</sup>	43,83 ± 3,52 <sup>c</sup>	19,74 ± 2,69 <sup>a</sup>	24,36 ± 2,58 <sup>a</sup>	85,93 ± 4,96 <sup>a</sup>	65,23 ± 2,69 <sup>c</sup>
3 giờ	70,73 ± 3,64 <sup>a</sup>	35,39 ± 2,64 <sup>b</sup>	21,81 ± 2,53 <sup>a</sup>	23,35 ± 2,73 <sup>a</sup>	82,66 ± 4,29 <sup>a</sup>	58,45 ± 3,61 <sup>a</sup>
4 giờ	70,93 ± 2,78 <sup>a</sup>	32,87 ± 3,75 <sup>a</sup>	19,35 ± 3,63 <sup>a</sup>	25,94 ± 3,51 <sup>a</sup>	80,75 ± 5,16 <sup>a</sup>	59,50 ± 2,43 <sup>a</sup>

Đối với từng chỉ tiêu, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ).

Hoạt lực tinh trùng trước đông lạnh khác nhau không có ý nghĩa ở các thời điểm bổ sung glycerol ( $p > 0,05$ ). Bổ sung môi trường có glycerol vào tinh dịch pha loãng ở thời điểm sau 2 giờ ủ ở 4°C, cho hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh cao hơn so với với bổ sung môi trường có glycerol ở thời điểm 0, 1, 3, 4 giờ ( $p < 0,05$ ). Hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh trong trường hợp bổ sung môi trường có glycerol ở thời điểm 1 giờ hoặc 3 giờ (37,68%; 35,39%) cao hơn so với thời điểm bổ sung môi trường có glycerol ở thời điểm 4 giờ (32,87%) ( $p < 0,05$ ). Hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh thấp nhất (31,74%) trong trường hợp bổ sung môi trường có glycerol ở thời điểm 0 giờ. Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình sau đông lạnh khác nhau không có ý nghĩa ở các thời điểm bổ sung môi trường có glycerol ( $p > 0,05$ ). Tỷ lệ sống của tinh trùng trước đông lạnh (85,93%) trong trường hợp bổ sung môi trường có glycerol ở thời điểm 2 giờ cao hơn so

với thời điểm bổ sung môi trường có glycerol ở thời điểm 0, 1, 3 hoặc 4 giờ (tỷ lệ sống của tinh trùng tương ứng là 82,52%, 80,87%, 82,66%, 80,75%) ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ tinh trùng sống sau đông lạnh cao hơn trong trường hợp bổ sung môi trường có glycerol ở thời điểm 1 hoặc 2 giờ so với các thời điểm bổ sung 0, 3, 4 giờ ( $p < 0,05$ ). Với kết quả nhận được, cho thấy bổ sung phần môi trường có glycerol ở thời điểm sau 2 giờ ủ tinh dịch ở 4°C cho phẩm chất tinh dịch sau đông lạnh tốt hơn so với bổ sung ở thời điểm 0, 1, 3 hoặc 4 giờ.

#### **Ảnh hưởng của thời gian ủ tinh dịch ở 4°C trước đông lạnh lên phẩm chất tinh đông lạnh**

Thời gian ủ tinh dịch trước đông lạnh ảnh hưởng không có ý nghĩa lên hoạt lực tinh trùng trước đông lạnh ( $p > 0,05$ ), nhưng ảnh hưởng có ý nghĩa lên hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh ( $p > 0,05$ ). Thời gian ủ tinh dịch trước đông lạnh

4 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 10 giờ cho hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh cao hơn so với thời gian 2 giờ ủ tinh dịch trước đông lạnh ( $p < 0,05$ ). Thời gian ủ tinh dịch trước đông lạnh 6 giờ cho hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh khác nhau không

có ý nghĩa so với thời gian ủ tinh dịch 8 giờ hoặc 10 giờ ( $p > 0,05$ ). Thời gian 2 giờ ủ tinh dịch cho hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh kém (26,72%).

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian ủ tinh dịch trước đông lạnh lên phẩm chất tinh đông lạnh

Thời gian ủ tinh dịch	Hoạt lực tinh trùng (%)		Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)		Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	
	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh	Trước đông lạnh	Sau đông lạnh
	2 giờ	69,16 ± 2,27 <sup>a</sup>	26,72 ± 1,90 <sup>a</sup>	20,98 ± 2,25 <sup>a</sup>	27,39 ± 2,11 <sup>a</sup>	75,64 ± 2,08 <sup>a</sup>
4 giờ	70,27 ± 0,95 <sup>a</sup>	32,63 ± 2,51 <sup>b</sup>	20,27 ± 1,78 <sup>a</sup>	24,31 ± 1,63 <sup>b</sup>	75,46 ± 0,87 <sup>a</sup>	67,06 ± 2,37 <sup>b</sup>
6 giờ	69,38 ± 1,33 <sup>a</sup>	41,57 ± 1,22 <sup>c</sup>	20,88 ± 2,26 <sup>a</sup>	23,39 ± 2,01 <sup>b</sup>	74,93 ± 2,09 <sup>a</sup>	69,04 ± 1,54 <sup>b</sup>
8 giờ	70,57 ± 2,58 <sup>a</sup>	41,74 ± 2,46 <sup>c</sup>	19,75 ± 2,52 <sup>a</sup>	24,95 ± 3,82 <sup>b</sup>	76,35 ± 2,58 <sup>a</sup>	68,51 ± 2,64 <sup>b</sup>
10 giờ	70,35 ± 2,61 <sup>a</sup>	39,94 ± 2,17 <sup>c</sup>	20,43 ± 2,58 <sup>a</sup>	32,69 ± 2,45 <sup>c</sup>	74,68 ± 3,14 <sup>a</sup>	67,24 ± 2,68 <sup>b</sup>

Đối với từng chỉ tiêu, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ).

Thời gian ủ tinh dịch trước đông lạnh ảnh hưởng không có ý nghĩa lên tỷ lệ tinh trùng kỳ hình trước và sau đông lạnh ( $p > 0,05$ ). Thời gian ủ tinh dịch trước đông lạnh ảnh hưởng không có ý nghĩa lên tỷ lệ tinh trùng sống trước đông lạnh ( $p > 0,05$ ), nhưng ảnh hưởng có ý nghĩa lên tỷ lệ sống của tinh trùng sau đông lạnh ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ sống của tinh trùng sau đông lạnh cao hơn trong trường hợp ủ tinh dịch 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ hoặc 10 giờ so với ủ tinh dịch trong khoảng thời

gian 2 giờ ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ sống của tinh trùng khác nhau không có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ) khi ủ tinh dịch ở các khoảng thời gian 4 giờ, 6 giờ, 8 giờ hoặc 10 giờ. Với kết quả nhận được, cho thấy thời gian tối thiểu ủ tinh dịch trước đông lạnh là 6 giờ. Thời gian ủ tinh dịch trước đông lạnh là 6 hoặc 8 giờ cho hoạt lực của tinh trùng sau đông lạnh tốt.

**Ảnh hưởng của nhiệt độ đông lạnh lên chất lượng tinh đông lạnh**

Bảng 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ đông lạnh lên chất lượng tinh đông lạnh

Chỉ tiêu theo dõi	Trước đông lạnh 5°C	Sau đông lạnh ở -130°C	Sau đông lạnh ở -165°C
Hoạt lực tinh trùng (%)	73,70 ± 1,22 <sup>a</sup>	35,85 ± 3,27 <sup>b</sup>	41,48 ± 3,71 <sup>c</sup>
Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	20,06 ± 1,83 <sup>a</sup>	24,84 ± 0,99 <sup>b</sup>	24,48 ± 1,61 <sup>b</sup>
Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	73,18 ± 2,61 <sup>a</sup>	50,16 ± 4,54 <sup>b</sup>	70,13 ± 1,39 <sup>c</sup>

Đối với từng chỉ tiêu, các giá trị trong cùng một hàng có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ).

Kết quả cho thấy, phương pháp hạ nhiệt độ tinh dịch xuống -165°C có tác dụng duy trì hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh (41,48%) cao hơn so với hoạt lực tinh trùng sau đông lạnh (35,85%) khi giảm nhiệt độ tinh dịch xuống -

130°C trước khi nhúng tinh cọng ra vào nito lỏng -196°C ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ tinh trùng sống sau đông lạnh (71,13%) cao hơn khi hạ nhiệt độ tinh dịch xuống -165°C so với tỷ lệ tinh trùng sau đông lạnh (50,16%) trong trường hợp hạ nhiệt

độ tinh dịch xuống  $-130^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,05$ ). Phương pháp đông lạnh tinh dịch ảnh hưởng không có ý nghĩa lên tỷ lệ kỳ hình của tinh trùng sau đông lạnh (24,84% so với 24,48%) ( $p > 0,05$ ). Phương pháp hạ nhiệt độ tinh dịch xuống  $-165^{\circ}\text{C}$  trước khi nhúng tinh cọng rạ vào nitơ lỏng có ảnh hưởng tốt hơn lên phẩm chất tinh trùng sau đông lạnh so với phương pháp hạ nhiệt độ tinh dịch xuống  $-130^{\circ}\text{C}$ .

#### KẾT LUẬN

Sử dụng môi trường đông lạnh 1 để đông lạnh tinh dịch chó Bắc Hà dạng cọng rạ cho chất lượng tốt về chất lượng tinh trùng sau đông lạnh. Bổ sung glycerol vào môi trường với nồng độ 6,5% hoặc 7,0% ở thời điểm sau 2 giờ ủ tinh ở  $4^{\circ}\text{C}$  có ảnh hưởng tốt lên sức sống của tinh trùng sau đông lạnh.

Thời gian tối thiểu ủ tinh dịch ở  $4^{\circ}\text{C}$  là 6 giờ. Hạ nhiệt độ tinh cọng rạ xuống  $-165^{\circ}\text{C}$  trước khi nhúng tinh cọng rạ vào nitơ lỏng  $-196^{\circ}\text{C}$  có ảnh hưởng tốt lên phẩm chất tinh trùng sau đông lạnh.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện trong khuôn khổ của đề tài “Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật sinh sản để phát triển và bảo tồn giống chó Bắc Hà phục vụ cho công tác an ninh, quốc phòng” thuộc chương trình đề tài cấp Viện Công nghệ sinh học 2015-2016.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Álamo D., Batista M., González F., Rodríguez N., Cruz G., Cabrera F., Gracia A., 2005. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of  $-152^{\circ}\text{C}$  as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology*, 63(1):72-82.
- Bessa A. M., Rocha A., Aguirre A. M., 2006. Comparing ethylene glycol with glycerol for cryopreservation of canine semen in egg-yolk TRIS extenders. *Theriogenology*, 66(9): 2047-2055.
- Cardoso R. C. S., Silva A. R., Uchoa D. C., Machado da Silva L. D., 2003. Cryopreservation of canine semen using coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, 59(3-4):743-751.
- De los Reyes M., Carrion R., Barros C., 2006. In vitro fertilization of in vitro matured canine oocytes using frozen-thawed dog semen. *Theriogenology*, 66(6-7): 1682-1684.
- Dobranski I., Lulal C., Barth A. D., Post K., 1993. Effects of four different extenders and three different freezing rates on post-thaw viability of dog semen. *J Reprod Fertil* 47(suppl): 291-6.
- Gill H. P., Kaufman C. F., Foote R. H., Kirk R. W., 1970. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *Am J Vet Res* 31: 1807-1813.
- Hay M. A., King WA, Gartley CJ, Leibo SP, Goodrowe KL, 1997. Effects of cooling, freezing and glycerol on penetration of oocytes by spermatozoa in dogs. *J Reprod Fertil* 51 (suppl): 99-108.
- Hermansson U., Forsberg C. L., 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology* 65(3): 584-593.
- Kutzler M. A., 2005. Semen collection in the dog. *Theriogenology*, 64(3): 747-754.
- Nöthling J. O., Shuttleworth R., 2005. The effect of straw size, freezing rate and thawing rate upon post-thaw quality of dog semen. *Theriogenology*, 63(5): 1469-1480.
- Peña A., Forsberg C. L., 2000. Effects of Equex, one- or two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology*, 54(6): 859-875.
- Rota A., Milani Ch., Cabianca G., Martini M., 2006. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, 65(9): 1848-1858.
- Seager S. J. W., 1969. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *A.I. Digest* 17: 6-16.
- Silva A.vR., Cardoso R. C. S., Uchoa D. C., Silva L. D. M., 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing



- process. *Theriogenology*, 59(3-4): 821-829.
- Somi S. S., Kluger S., Knapp E., Klein D., Aurich C., 2006. Effects of semen extender and semen processing on motility and viability of frozen-thawed dog spermatozoa. *Theriogenology*, 66(2): 173-182.
- Yildiz C., Kaya A., Aksoy M., Tekeli T., 2000. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 54(4): 579-585.

## RESEARCH BAC HA DOG SEMEN FROZEN IN LIQUID NITROGEN -196°C

Do Van Thu\*, Doan Viet Binh, Tran Xuan Khoi, Le Thi Hue

Institute of Biotechnology, VAST

### SUMMARY

Bac Ha dog is a endemic breed living in Bac Ha district of Lao Cai Province. They have many good characteristics to train the dogs. But now due to spontaneous breeding and management is not tight, Bac Ha dog hybrid is pretty much, they lose those characteristics. Research dog frozen semen Bac Ha is an effective solution to conserve genetic resources and developing precious dogs.

In this experiment, 50 semen samples from 6 Bac Ha dog were took which is bred naturally. The semen sample had motility rate higher than 70%, living rate higher than 85% and abnormality rate lower than 20% is used in the frozen testing. These factors influence the quality of frozen semen were surveyed after the experiment: the effect of freezing extender; effects of cryoprotectants glycerol and ethylene glycol; the influence of semen diluted incubation period before freezing; the effects of freezing temperatures.

Results showed that frozen semen in frozen extender1 has motility rate after freezing (41.01%) significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared with frozen semen in extender2 (34.17%). Proportion of living sperm after freezing by extender1 (66.95%) significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared with extender2 (57.93%). Motility of sperm frozen in case additional glycerol (42.65%) significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared with the additional ethylene glycol (35.15%). Additional glycerol into the extender at concentrations of 6.5% or 7.0% have a positive impact on the viability of frozen sperm. Additional extenders glycerol in time after 2 hours of sperm incubation at 4°C positive impact on sperm quality after freezing. The minimum incubation period before dilution frozen semen is 6 hours. Semen diluted incubation time 6 or 8 hours before freezing has motility rate after freezing well. Lower temperatures of the straws down to -165°C before dip straws into liquid nitrogen at -196°C have a better impact on sperm quality after freezing than lower to -130°C.

*Keywords:* Bac Ha dogs, frozen semen, semen straws.

*Citation:* Do Van Thu, Doan Viet Binh, Tran Xuan Khoi, Le Thi Hue, 2017. Research Bac Ha dog semen frozen in liquid nitrogen -196°C. *Tap chi Sinh hoc*, 39(2): 236-244. DOI: 10.15625/0866-7160/v39n2.8867.

\*Corresponding author: dovanthu\_ibt@yahoo.com

Received 16 November 2016, accepted 20 June 2017