ĐÔNG LẠNH TINH TRÙNG LỢN BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỦY TINH HÓA

Lê Hồng My[1], Mai Bá Thiên Phước[1],
Dương Nguyễn Duy Tuyền[2], Trần Thị Thanh Khương[1*]

TÓM TẮT

Nghiên cứu thực hiện nhằm đông lạnh thủy tinh hóa tinh trùng lợn và sự ảnh hưởng nồng độ chất bảo quản glycerol trong môi trường pha loãng để tinh trùng sau khi đông lạnh ít bị ảnh hưởng đến tỷ lệ sức sống, hoạt lực và có thể phối giống nhân tạo. Tinh trùng của giống lợn Landrace, Duroc và lợn lai Duroc x Landrace (n = 9; r = 3) đã xử lý sẽ pha loãng với môi trường có bổ sung glycerol ở các nồng độ 4, 6 và 8%. Mẫu được đưa vào các ống trữ lạnh (cryotube) 1,5 mL để tiến hành đông lạnh thủy tinh hóa ở -196°C. Sau 72 giờ lưu trữ, tiến hành giải đông ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Chỉ tiêu về tỷ lệ sức sống và hoạt lực sẽ được đánh giá ở các mẫu trước và sau đông lạnh. Kết quả nghiên cứu ghi nhận: sau lưu trữ lạnh, các mẫu khi pha loãng với môi trường ở glycerol 8% có tỷ lệ sức sống (37,55; 39,44; 37,99%) và hoạt lực (34,56; 36,79; 34,83%) cao hơn các mẫu ở nồng độ 4% và 6%. Kết quả nghiên cứu: xây dựng thành công quy trình đông lạnh tinh trùng lợn bằng phương pháp thủy tinh hóa với nồng độ glycerol 8% trong môi trường đông lạnh cho kết quả đông lạnh tinh trùng lợn tốt, có tỷ lệ tinh trùng di động tiến thẳng cao.

Từ khóa: *Glycerol, tinh trùng lợn, bảo quản lạnh tinh trùng, thủy tinh hóa, -196°C.*

1. GIỚI THIỆU

Thời gian gần đây, dịch bệnh tả lợn châu Phi đã gây ra nhiều hậu quả nghiêm trọng đến ngành chăn nuôi lợn, ảnh hưởng đến kinh tế và đời sống của người dân. Rất nhiều nghiên cứu đã chứng minh, tinh dịch lợn chính là nhân tố mang theo mầm bệnh và ảnh hưởng trực tiếp đến chất lượng đàn lợn (Guerin và Pozzi, 2005; Maes et al., 2016). Cụ thể, virus Circo loại 2 (PCV2) gây ra bệnh suy giảm đa hệ thống sau cai sữa đã được phát hiện dương tính trên mẫu tinh dịch của lợn khỏe mạnh. Bên cạnh đó, PRRS gây ra bệnh tai xanh, ASFV virus và CSF virus gây ra dịch tả lợn châu Phi và dịch tả lợn cổ điển cũng được tìm thấy trong tinh dịch và đó sẽ là một con đường truyền bệnh nhanh nếu sử dụng tinh dịch tươi cho gieo tinh nhân tạo. Giải pháp trước mắt để loại trừ mầm bệnh ra khỏi tinh dịch trước khi gieo tinh nhân tạo là cần phải chọn lọc nguồn tinh dịch âm tính với mầm bệnh, tiến hành lưu trữ và bảo quản nguồn tinh sạch tránh lây nhiễm về sau. Để chất lượng tinh dịch được toàn vẹn trong thời gian sàng lọc, điều cần thiết là tinh trùng phải được bảo quản ở dạng đông lạnh trong nitơ lỏng (LN_2) mới có thể bảo tồn khả năng sinh sản.

Hơn thế nữa, tinh trùng đông lạnh thể hiện tính vượt trội đối với tinh trùng tươi trong việc lai tạo xa và lai với số lượng lớn các giống lợn mang những tính trạng quý, xuất nhập khẩu giống lợn và đặc biệt ý nghĩa trong bảo tồn giống lợn bản địa (Nguyễn Anh, 2004).

Trong các phương pháp bảo quản tinh trùng động vật, phương pháp đông lạnh chậm đang được sử dụng phổ biến vì cho kết quả tốt sau khi giải đông (Fuller et al., 2004; Donnez và Kim, 2011). Nhưng hạn chế lớn của phương pháp này là cần hệ thống thiết bị hạ nhiệt độ và thời gian giảm nhiệt độ kéo dài (Phan Thị Thanh Lan, 2020), điều này chỉ phù hợp với những trung tâm hoặc phòng thí nghiệm được đầu tư tài chính lớn (Riva et al., 2018). Để khắc phục tình trạng trên, tinh trùng được bảo quản bằng phương pháp đông lạnh nhanh hay phương pháp thủy tinh hóa được coi là một phương pháp thay thế tiềm năng cho phương pháp đông lạnh chậm (Shah et al., 2019). Với phương pháp thủy tinh hóa, toàn bộ khối vật chất bên trong tế bào chuyển thành dạng kính, nhờ thế tránh được những tổn thương nội bào trong suốt quá trình hạ nhiệt độ (Fahy et al., 2009). Đây là phương pháp đơn giản dễ thực hiện, tiết kiệm thời gian và kinh phí, đồng thời tỷ lệ tế bào sống sau

[1] Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, Trường Đại học Cần Thơ
[2] Đơn vị hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Đa khoa Mỹ Đức thành phố Hồ Chí Minh
*Email: tttkhuong@ctu.edu.vn

giải đông cao và đã được ứng dụng thường quy trên tinh trùng người (Vajta và Nagy, 2006; Tao et al., 2020).

Với những lợi ích cấp thiết của thụ tinh nhân tạo lợn bằng phương pháp đông lạnh và tính đơn giản của phương pháp thủy tinh hóa có thể thực hiện ở bất kỳ phòng thí nghiệm hoặc trại thú y nào, có thể áp dụng ngay tại chỗ ở những nơi mà cần trữ lạnh khẩn cấp tinh trùng, nghiên cứu này được thực hiện. Bước đầu chứng minh sức sống của tinh trùng lợn sau đông lạnh và từ đó cải tiến để có thể ứng dụng gieo tinh nhân tạo trên đàn lợn góp phần ứng phó với những vấn đề như: dịch bệnh, thiên tai, bảo tồn, lai xa, xuất nhập khẩu là những rào cản mà sử dụng nguồn tinh tươi không thể vượt qua.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

Tinh trùng lợn pha sẵn nhập ngoại giống lợn Duroc, Landrace và lợn lai Duroc x Landrace, được mua tại trại giống ở thành phố Cần Thơ.

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu: $NaHCO_3$ (Merck), NaCl (Merck), KCl (Merck), Sodium citrate (Merck), Formol (Xilong Scientific), Cristial violet; Lactose (Merck), Glucose (Merck), Glycerol (Xilong Scientific), DMSO (Merck), Norfloxacin (Fertizone), lòng đỏ trứng gà (Egg yolk, Merck), EDTA (Merck), Eosin (HiMedia), Nigrosin (Merck).

2.2. Phương pháp

2.2.1. Chuẩn bị tinh trùng lợn

Thu nhận tinh trùng lợn bằng phương pháp ly tâm lạnh và đánh giá chất lượng tinh trùng trước khi thực hiện đông lạnh tinh trùng lợn nhằm thu được mẫu tinh trùng phù hợp.

Mẫu tinh trùng từ chai tinh trùng lợn pha sẵn môi trường bảo quản sau khi lấy từ trại giống được ly tâm lạnh 600×g mẫu tinh trùng ở nhiệt độ 18°C trong 10 phút. Đặt ống ly tâm thẳng đứng trở lại và hút khoảng 1 mL phần phía dưới, chứa nhiều tinh trùng di động, chuyển vào ống đựng khác. Thực hiện các đánh giá để lựa chọn các mẫu tinh trùng phù hợp với chỉ tiêu chất lượng TCVN 11841:2017 về quy trình khảo nghiệm, kiểm định môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn.

Thí nghiệm được thực hiện với tinh trùng của 3 giống lợn Duroc, Landrace và lợn lai Duroc x Landrace, 3 con lợn mỗi giống, mỗi con lợn lặp lại 3 lần (n = 9; r = 3).

2.2.2. Khảo sát ảnh hưởng nồng độ chất bảo quản lạnh glycerol cho đông lạnh tế bào tinh trùng lợn.

Tiến hành pha môi trường đông lạnh tinh trùng (Freezing Extender, FE) có bổ sung glycerol với các thành phần theo tỷ lệ để thực hiện 3 nghiệm thức: (4% Glycerol + 20% lòng đỏ trứng gà + 75,9% lactose 11% + 0,1% Norfloxacin); (6% Glycerol + 20% lòng đỏ trứng gà + 73,9% lactose 11% + 0,1% Norfloxacin) và (8% Glycerol + 20% lòng đỏ trứng gà + 75,9% lactose 11% + 0,1% Norfloxacin). Mẫu tinh trùng lợn sau khi đánh giá chất lượng phù hợp cho đông lạnh được pha loãng với các môi trường đông lạnh đã chuẩn bị theo tỉ lệ 1:1. Tiến hành kiểm tra dưới kính hiển vi các tác động của môi trường đông lạnh đến tinh trùng lợn.

2.2.3. Đông lạnh tinh trùng lợn bằng phương pháp thủy tinh hóa ở -196°

Sau khi khảo sát, các mẫu tinh trùng lợn được chuyển vào ống trữ lạnh (cryotube) với thể tính là 1 mL. Chuẩn bị thùng (30 cm × 40 cm) chứa ni-tơ lỏng. Đưa cẩn thận cryotube vào thùng xốp và đặt cryotube cách bề mặt ni-tơ lỏng 3 cm trong 5 phút. Sau đó đưa mẫu trực tiếp vào bình chứa ni-tơ lỏng (-196°C) để lưu trữ trong 72 giờ.

2.2.4. Giải đông và đánh giá chất lượng tinh trùng lợn sau đông lạnh.

Giải đông ở nhiệt độ 27°C trong 15 phút. Sau đó mẫu được ly tâm lạnh 600×g trong 1 phút để loại bỏ môi trường đông lạnh và bổ sung môi trường BTS (Bảng 1) cho tinh trùng lợn với tỉ lệ 1:1.

Đánh giá sức sống và hoạt lực tinh trùng lợn sau đông lạnh nhằm xác định ở các nồng độ chất bảo quản glycerol 4; 6 và 8% hiệu quả cao nhất và đảm bảo được chỉ tiêu chất lượng tinh trùng lợn thu được sau quá trình bảo quản lạnh có hoạt lực tinh trùng tiến thẳng đạt ≥ 30% (TCVN 11841:2017).

2.2.5. Phân tích kết quả và xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được tổng hợp, so sánh và xử lý thống kê theo phương pháp phân tích ANOVA bằng phần mềm Minitab 16.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả về các chỉ tiêu chất lượng tinh trùng lợn cho quy trình đông lạnh

Chất lượng tinh trùng ban đầu là yếu tố quan trọng quyết định đến chất lượng mẫu trong quá trình thí nghiệm và bảo quản lạnh. Sau khi thu mẫu tại trại giống, các mẫu tinh trùng được đánh giá cảm quan tại phòng thí nghiệm về mùi, màu sắc và xác định độ pH đối với các mẫu tinh trùng.

Bảng 1. Chỉ tiêu chất lượng tinh trùng lợn trước khi thực hiện đông lạnh

Chỉ tiêu đánh giá	Giống		
	Duroc	Landrace	Lợn lai Du x LR
Sức sống (Sg%)	90,61± 0,09[a]	92,70± 0,16[b]	89,81± 0,11[c]
Hoạt lực (A%)	87,95± 0,08[a]	89,85± 0,08[b]	87,23± 0,09[c]
Mật số tinh trùng ($\times 10^8$ tinh trùng/mL)	1,59± 0,01[a]	1,59± 0,02[a]	1,58± 0,03[a]

Các chỉ tiêu về mùi, màu sắc của các mẫu khảo sát đều bình thường, có những đặc trưng của tinh trùng lợn. Giá trị pH của tinh dịch ở lợn Duroc, Landrace và lợn lai Du x LR là không có sự khác biệt. Độ pH của tinh trùng ba giống lợn đều có tính hơi kiềm (pH khoảng 7,2 – 7,3) phù hợp với TCVN 9111:2011 về pH tinh trùng lợn giống ngoại nuôi tại nước ta.

Từ kết quả bảng 1, thấy rằng ở lợn Landrace, các chỉ tiêu về tỷ lệ sức sống là 92,70±0,16%; hoạt lực là 89,85±0,08% và mật số tinh trùng là 1,59±0,02 ($\times 10^8$ tinh trùng/mL). Tương ứng với các chỉ tiêu trên ở lợn Duroc là 90,61±0,09%; 87,95±0,08% và 1,59±0,01 ($\times 10^8$ tinh trùng/mL). Cuối cùng, ở lợn lợn lai Du x LR là 89,81±0,11%; 87,23±0,09% và 1,57±0,03 ($\times 10^8$ tinh trùng/mL). Từ các số liệu trên, kết quả ở giống lợn Landrace có tỷ lệ sức sống và hoạt lực tinh trùng cao hơn giống lợn Duroc và Du-land tại các thời điểm thực hiện thí nghiệm. Cả ba giống lợn Duroc, Landrace và lợn lai Du x LR đều có mật số tinh trùng là tương đương nhau và khác biệt là không có ý nghĩa về mặt thống kê. Kết quả đạt được cao hơn so với TCVN 11841:2017, có thể nhận định nồng độ tinh trùng trong tinh dịch lợn trong mẫu ban đầu từ trại giống có chất lượng tốt.

Tinh trùng của lợn Duroc, Landrace và lợn lai Du x LR khi bổ sung môi trường đông lạnh chứa chất bảo quản lạnh glycerol ở các nồng độ 4, 6, 8% và ổn định, sẽ được đánh giá kết quả về tỷ lệ sức sống và hoạt lực tinh trùng nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của glycerol đến tinh trùng lợn.

Bảng 2. Chất lượng tinh trùng trước đông lạnh ở lợn Duroc, Landrace và lợn lai Du x LR đã bổ sung môi trường pha loãng chứa glycerol ở các nồng độ 4%, 6% và 8%

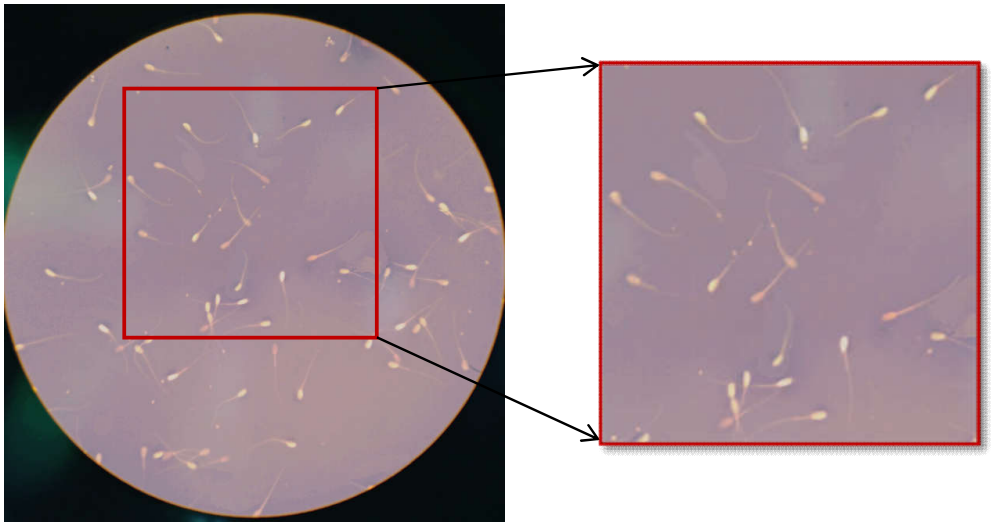
Chỉ tiêu đánh giá	Giống lợn	Nồng độ glycerol trong môi trường pha loãng		
		Glycerol 4%	Glycerol 6%	Glycerol 8%
Sức sống (Sg%)	Duroc	88,37±0,35[a]	86,08±0,12[b]	84,59±0,19[c]
	Landrace	90,09±0,13[a]	88,51±0,08[b]	86,32±0,46[c]
	Lợn lai Du x LR	88,28±0,11[a]	86,09±0,18[b]	84,43±0,19[c]
Hoạt lực (A%)	Duroc	85,76±0,09[a]	84,70±0,69[b]	82,64±0,13[c]
	Landrace	87,26±0,10[a]	86,48±0,20[b]	85,08±0,91[c]
	Lợn lai Du x LR	85,72±0,13[a]	84,60±0,36[b]	82,50±0,29[c]

Cụ thể trong bảng 2, kết quả ở lợn Landrace khi bổ sung môi trường đông lạnh có chứa chất bảo quản lạnh glycerol ở các nồng độ 4, 6, 8% có tỷ lệ sức sống lần lượt là 90,09±0,13%, 88,51±0,08%, 86,32±0,46%; hoạt lực là 87,26±0,1%, 86,48±0,2%, 85,08±0,91%. Tương ứng ở lợn Duroc, tỷ lệ sức sống lần lượt là 88,37±0,35%, 86,08±0,12%, 84,59±0,19%; hoạt lực là 85,76±0,09%, 84,70±0,69%, 82,64±0,13%. Cuối cùng, ở lợn lai Du x LR, tỷ lệ sức sống là 88,28±0,11%, 86,09±0,18%, 84,43±0,19%; hoạt lực là 85,72±0,13%, 84,60±0,36%, 82,50±0,29%. Khi so sánh về giống, giống lợn Landrace cho kết quả cao hơn giống Duroc và lợn lai Du x LR về tỷ lệ sức sống và hoạt lực ở tất cả các môi trường pha loãng. Khi khảo sát sự ảnh hưởng của glycerol đến các mẫu trước đông lạnh, tỷ lệ sức sống và hoạt lực của mẫu tinh trùng lợn pha loãng với môi trường có glycerol 4% cao hơn các mẫu ở hai nồng độ glycerol 6 và 8%. Chứng tỏ rằng: Glycerol có ảnh hưởng đến tinh trùng lợn khi bổ sung môi trường pha loãng vào các mẫu. Dựa theo kết quả, nồng độ glycerol càng cao sẽ càng làm giảm tỷ lệ sức sống và hoạt lực của tinh trùng lợn, điều này là phù hợp với báo cáo của Gangawar et al., 2016 về tác động của glycerol đến tế bào tinh trùng ở nhiệt

độ thường. Glycerol thường được sử dụng làm chất bảo vệ lạnh thâm nhập và có khả năng thẩm thấu qua màng tế bào và ít gây độc cho các tế bào (Gangawar et al., 2016). Glycerol hỗ trợ cho nồng độ chất tan nội bào cân bằng với ngoại bào, ngăn chặn sự co rút do mất nước và tổn thương tế bào (Megan Scudellary, 2013). Ưu điểm khi sử dụng glycerol làm chất bảo quản là có độc tính thấp, tuy nhiên, ở nhiệt độ thường, glycerol vẫn khiến tế bào tinh trùng bị mất nước và suy giảm tỷ lệ sức sống và hoạt lực (Gangawar et al., 2016).

Tỷ lệ sức sống và hoạt lực của các mẫu đều ≥ 80% và đạt TCVN 11841: 2017 để tiến hành đông lạnh và bảo tồn tinh trùng lợn.

3.2. Kết quả về ảnh hưởng của glycerol đến tinh trùng lợn sau khi thực hiện đông lạnh



Hình 1. Mẫu đánh giá tỷ lệ sức sống (Sg%) tinh trùng lợn sau khi đông lạnh bằng phương pháp nhuộm Eosin - Nigrosin quan sát dưới kính hiển vi quang học ở độ phóng đại 400 lần

(a. Tinh trùng sống: hình thái tế bào nguyên vẹn, không bắt màu với thuốc nhuộm Eosin; b. Tinh trùng chết: bắt màu với thuốc nhuộm Eosin)

Bảng 3. Chất lượng tinh trùng trước đông lạnh ở giống lợn Duroc, Landrace và lợn lai Du x LR đã bổ sung môi trường pha loãng chứa glycerol ở các nồng độ 4, 6 và 8%

Chỉ tiêu đánh giá	Giống lợn	Nồng độ glycerol trong môi trường pha loãng		
		Glycerol 4%	Glycerol 6%	Glycerol 8%
Sức sống (Sg%)	Duroc	18,68±0,22^{a}	29,51 ± 0,72^{b}	37,55±0,11^{c}
	Landrace	20,25±0,52^{a}	32,25±0,21^{b}	39,44±0,30^{c}
	Lợn lai Du x LR	19,28±0,40^{a}	29,02±0,57^{b}	37,99±0,20^{c}
Hoạt lực (A%)	Duroc	15,33±0,22^{a}	34,56±0,27^{b}	82,64±0,13^{c}
	Landrace	16,73±0,39^{a}	36,79±0,48^{b}	37,99±0,20^{c}
	Lợn lai Du x LR	15,26±0,19^{a}	34,83±0,69^{b}	82,50±0,29^{c}

Ở giống lợn Landrace ở môi trường pha loãng có các nồng độ glycerol 4, 6 và 8% được đánh giá sau khi giải đông có có tỷ lệ sức sống lần lượt 20,25±0,52%, 32,62±0,17%, 39,44±0,30%; hoạt lực là 16,73±0,39%, 32,25±0,21%, 36,79±0,48%. Tương ứng ở giống lợn Duroc, tỷ lệ sức sống lần lượt là 18,68±0,22%, 30,03±0,17%, 37,55±0,11%; hoạt lực là 15,33±0,22%, 29,51±0,72%, 34,56±0,27%. Cuối cùng, ở lợn lai Du x LR, tỷ lệ sức sống là 19,28±0,40%, 29,66±0,56%, 37,99±0,20%; hoạt lực là 15,26±0,19%, 29,02±0,57% và 34,83±0,69%. Khi so sánh về giống sau giải đông, giống lợn Landrace vẫn có kết quả cao hơn Duroc và lợn lai Du x LR về tỷ lệ sức sống và hoạt lực ở tất cả các môi trường pha loãng. Tỷ lệ sức sống và hoạt lực của các mẫu tinh trùng lợn được đông lạnh với môi trường có bổ sung glycerol 8% cao hơn các mẫu ở hai

nồng độ glycerol 6% và 4%. Có thể thấy rằng, ở nhiệt độ thường, mẫu có bổ sung môi trường pha loãng chứa glycerol 8% cho kết quả về tỷ lệ sức sống và hoạt lực tinh trùng thấp hơn ở nồng độ 4% và 6%. Tuy nhiên, ở nhiệt độ rất thấp thì glycerol nồng độ 8% cho hiệu quả đông lạnh tốt hơn nồng độ 4% và 6%. Từ kết quả cho thấy quá trình đông lạnh cũng có ảnh hưởng đến tế bào tinh trùng, nhưng nhờ khả năng bảo quản nội bào của glycerol nên ở các mẫu tinh trùng lợn bổ sung môi trường pha loãng có glycerol nồng độ 8% cho kết quả cao và phù hợp với TCVN 11841:2017, qua đó có khả năng sử dụng mẫu để tiến hành phối giống nhân tạo để kiểm tra khả năng thụ tinh.

Khi so sánh kết quả với phương pháp đông lạnh chậm (slow-freezing). Phương pháp thủy tinh hóa đã khắc phục được nhược điểm thời gian khi thực hiện quy trình đông lạnh tinh trùng. Ngoài ra, nhờ sự cải tiến quy trình mà kết quả của hai phương pháp đông lạnh là xấp xỉ như nhau. Mặc dù kết quả nghiên cứu khi so sánh với báo cáo của Arraztoa et al., 2017 vẫn thấp hơn về tỷ lệ sức sống (46, 00±3,40%) và hoạt lực tinh trùng (44,20±4,30%) khi cùng thực hiện bằng phương pháp đông lạnh thủy tinh hóa tế bào tinh trùng lợn. Tuy nhiên, khi so sánh hoạt lực tinh trùng ở mẫu của giống lợn Landrace có môi trường pha loãng chứa glycerol 8% của thí nghiệm (36,79±0,48%) cao hơn so với kết quả của Đào Đức Thà và cộng sự, 2007 (35,67±1,14%) khi thực hiện đông lạnh chậm tinh trùng lợn có sử dụng chất bảo quản lạnh glycerol.

4. KẾT LUẬN

Bằng phương pháp đông lạnh nhanh, sức sống tinh trùng lợn của ba giống lợn Duroc, Landrace và lợn lai Duroc x Landrace đã được bảo vệ sau 72 giờ khảo sát. Trong đó, điều kiện bảo quản với tỷ lệ sống và di động cao là 8% Glycerol + 20% lòng đỏ trứng gà + 5,9% lactose 11% + 0,1% norfloxacin, cụ thể với tỷ lệ sống và khả năng di động cao lần lượt là 37,63±0,45 và 34,22±0,07%. Kết quả nghiên cứu còn chứng minh khả năng giải đông tinh trùng lợn ở nhiệt độ phòng cho kết quả cao và đây là điều kiện phù hợp trong trường hợp áp dụng và chuyển giao phương pháp.

Phương pháp thủy tinh hóa thể hiện tính hiệu quả trong điều kiện tiết kiệm thời gian, yêu cầu về trang thiết bị thấp và rất cấp thiết trong trường hợp dịch bệnh, thiên tai, phục hồi đàn sau dịch bệnh, bão lụt kéo dài và rất có ý nghĩa trong bảo tồn giống quý hiếm cũng như giống địa phương.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được hỗ trợ kinh phí thực hiện từ Quỹ nghiên cứu khoa học của Trường Đại học Cần Thơ, mã đề tài TSV2019-138.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đào Đức Thà, Đỗ Hữu Hoan, Nguyễn Đình Dũng, Văn Lệ Hằng, 2007. Nghiên cứu kỹ thuật đông lạnh tinh dịch lợn dạng cọng rạ. *Báo cáo khoa học Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, Hà Nội. NXB Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

2. Nguyễn Anh, 2004. Báo cáo kết quả thực hiện đề tài nghiên cứu triển khai công nghệ bảo quản tinh đông lạnh lợn Ỉ nhằm bảo tồn nguồn gen quý hiếm của Việt Nam. Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

3. Phan Thị Thanh Lan, 2020. Nghiên cứu hiệu quả của hai phương pháp đông phôi chậm và đông phôi thủy tinh hóa. *Luận văn tiến sĩ y khoa*, Trường Đại học Y Hà Nội.

4. TCVN 11841: 2017, Quy trình khảo nghiệm, kiểm định môi trường pha loãng và bảo tồn tinh dịch lợn.

5. TCVN 9111:2011, Lợn giống ngoại - Yêu cầu kỹ thuật.

6. Arraztoa, C. C., Miragaya, M. H., Chaves, M. G., Trasorras, V. L., Gambarotta, M. C., Péndola, C. H., Neild, D. M., 2017. Porcine sperm vitrification I: cryoloops method. Andrologia 49.

7. Diaz-Jimenez, M., Dorado, J., Consuegra, C., Ortiz, I., Pereira, B., Carrasco, J. J., Gomez-Arrones, V., Domingo, A., Hidalgo, M., 2019. Optimization of donkey sperm vitrification: Effect of sucrose, sperm concentration, volume and package (0.25 and 0.5 mL straws). Anim. Reprod. Sci. 204, pp. 31-38.

8. Donnez, J., Kim, S. S., 2011. Principles and Practice of Fertility Preservation. Cambridge University Press.

9. Fuller, B. J., Lane, N., Benson, E. E., 2004. Life in the Frozen State. CRC Press.

10. Gangawar, C., Kharche, S. D., Kumar, S., Jindal, S., 2016. Cryopreservation of goat semen: status and prospects. Indian Journal of Small Ruminants (The) 22, 1.

11. Guérin., B, Pozzi., N, 2005. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as

epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination.. *Theriogenology,* 63(2), pp. 556-572.

12. Kagalwala, S., 2015. Sperm Vitrification, in: Allahbadia, G., Kuwayama, M., Gandhi, G. (Eds.), Vitrification in Assisted Reproduction: A User's Manual. Springer India, New Delhi, pp. 31-42.

13. Karlsson, J. O. M., Szurek, E. A., Higgins, A. Z., Lee, S. R., Eroglu, A., 2014. Optimization of Cryoprotectant Loading into Murine and Human Oocytes. Cryobiology 68, pp. 18-28.

14. Maes, D., Van Soom, A., Appeltant, R., Arsenakis, I., & Nauwynck, H., 2016. Porcine semen as a vector for transmission of viral pathogens. *Theriogenology,* 85(1), pp. 27-38.

15. Megan Scudellary, 2013. Icing organs. The Scientist explore life, inspiring innovation.

16. Nouri Gharajelar, S., Sadrkhanloo, R.A., Onsori, M., Saberivand, A., 2016. A comparative study on the effects of different cryoprotectants on the quality of canine sperm during vitrification process. *Vet Res Forum* 7, pp. 235-239.

17. Saint Jalme, M., Lecoq, R., Seigneurin, F., Blesbois, E., Plouzeau, E., 2003. Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species. Theriogenology 59, pp. 875-888.

18. Shah, D., Rasappan, Shila, Gunasekaran, K., 2019. A simple method of human sperm vitrification. MethodsX 6, pp. 2198-2204.

19. Shalom-paz, E., Alshalati, J., Shehata, F., Jimenez, L., Son, W., Holzer, H., Tan, S. L., Almog, B., 2011. Clinical and economic analysis of rescue intracytoplasmic sperm injection cycles. Gynecological Endocrinology 27, pp.993-996.

20. S. Riva, N., Ruhlmann, C., S. Iaizzo, R., López, C. A. M., Martínez, A. G., 2018. Comparative analysis between slow freezing and ultra-rapid freezing for human sperm cryopreservation. JBRA Assist Reprod 22, pp. 331-337.

21. Tao, Y., Sanger, E., Saewu, A., & Leveille, M. C. (2020). Human sperm vitrification: the state of the art. Reproductive biology and endocrinology : RB&E, 18(1), 17.

22. WHO – World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: World Health Organization; 2010.

CRYOPRESERVATION OF PORCINE SEMEN BY VITRIFICATION

Le Hong My, Mai Ba Thien Phuoc, Duong Nguyen Duy Tuyen, Tran Thi Thanh Khuong

Summary

This study aims to develop a procedure of frozen porcine spermatozoa by vitrification and investigate the effect of glycerol concentration on the viability and mobility of porcine spermatozoa during cryopreservation and post-thawing. Porcine sperm from 3 different breeds Landrace, Duroc and Duroc-landrace hybrid (n = 9; r = 3) was prepared by centrifuging at a rate of 600×g for 10 minutes at 18°C to eliminate seminal plasma, after that porcine spermatozoa were diluted in media included lactose and egg-yolk (v.v.), in the different concentration of glycerol (4, 6, 8%) to access the affects of glycerol concentration on sperm quality and vitrified using the cryotube method in nitrogen for 72 hours. The percentage of motile sperm (observed directly under an optical microscope) and the percentage of alive sperm (Eosin - Nigrosin staining) were evaluated in pre-vitrification and post-vitrification samples. Results suggest that preservative concentration of 8% sperm resulted in a higher viability (37.55; 39.44; 37.99%) and motility (34.56; 36.79; 34.83%) rate than the samples at other concentrations: 4% and 6%. In conclusion, vitrification is a simple technique and a potential tool in reproductive management at pig farms but requires careful research, by determining the concentration and type of cryoprotectant as well as other factors related to vitrification and thawing.

Keywords: *Glycerol, porcine spermatozoa, cryopreservation, vitrification, -196°C.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đức
Ngày nhận bài: 6/11/2020
Ngày thông qua phản biện: 7/12/2020
Ngày duyệt đăng: 14/12/2020