

# ẢNH HƯỞNG CỦA NGUỒN CARBON ĐẾN CHẤT LƯỢNG TINH TRÙNG THỎ ĐEN VIỆT NAM TRONG BẢO QUẢN LÔNG

Trần Thị Thanh Khương\*, Nguyễn Lâm Khánh Duy

Phòng Thí nghiệm Tế bào gốc, Viện Công nghệ sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

## TÓM TẮT

Môi trường bảo quản lông và thời gian bảo quản đóng vai trò quan trọng trong việc duy trì và ổn định chất lượng tinh trùng. Mục tiêu của nghiên cứu là xác định nguồn carbon thích hợp và thời gian tối ưu để bảo quản tinh trùng thỏ đen Việt Nam tốt nhất. Nghiên cứu đã đánh giá vai trò của ba nguồn carbon khác nhau trong môi trường bảo quản: glucose, fructose và sucrose. Thí nghiệm được thiết kế bao gồm 6 nghiệm thức tương ứng với 6 loại môi trường bảo quản, mỗi nghiệm thức lặp lại 6 lần. Mẫu tinh dịch sau khi thu nhận được pha loãng với môi trường bảo quản theo tỷ lệ 1:10, sau đó bảo quản mẫu ở nhiệt độ 15°C. Việc đánh giá chất lượng theo các mốc thời gian cụ thể là 0 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ. Kết quả nghiên cứu cho thấy chất lượng tinh trùng giảm dần theo thời gian bảo quản. Kết quả đánh giá vi thể cho thấy, chất lượng tinh trùng giảm dần theo thời gian bảo quản và đạt chất lượng tốt nhất khi sử dụng môi trường Tris Citrate Sucrose 29 mM đến 48 giờ bảo quản, cụ thể tỷ lệ di động tổng số là 49,27%, di động tiến tới là 30,71%, tỷ lệ sống là 62,45% và tỷ lệ tinh trùng toàn vẹn màng tế bào là 44,32%.

*Từ khóa:* Bảo quản lông, nguồn carbon, tinh trùng, thỏ đen Việt Nam, Tris Citrate Glucose.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Gieo tinh nhân tạo - Artificial Insemination (AI) là kỹ thuật lấy tinh dịch có tế bào sinh dục đực (tinh trùng) trên động vật còn sống và đưa vào cơ quan sinh dục con cái tại thời điểm thích hợp. Gieo tinh nhân tạo không chỉ mang lại khả năng thụ thai cho con cái mà còn là công cụ quan trọng được sử dụng để cải thiện chăn nuôi giúp tăng nhanh số lượng và hiệu quả kinh tế. Áp dụng gieo tinh nhân tạo hiệu quả nhờ vào chất lượng tinh dịch cao giúp giảm đáng kể các bệnh lây lan qua đường sinh sản thông qua giao phối trực tiếp (Parkinson *et al.*, 2019). Bảo quản tinh trùng tạo điều kiện thuận lợi cho việc vận chuyển và lưu trữ cho mục đích trong công nghệ sinh sản nhân tạo, bảo tồn loài và y học lâm sàng. Sự kết hợp giữa nhiệt độ bảo quản, tốc độ làm mát, thành phần hóa học của chất kéo dài, nồng độ chất bảo vệ lạnh, các loại oxy phản ứng (ROS), thành phần huyết tương tinh dịch và kiểm soát vệ sinh là những yếu tố chính ảnh hưởng đến tuổi thọ của tinh trùng (Barbas *et al.*, 2009). Những phát triển chính trong AI bao gồm chất bảo quản lông, bảo quản đông lạnh và công nghệ tinh dịch phân biệt giới tính (Sharma *et al.*, 2024). AI thành công đòi hỏi tinh trùng chất lượng cao, trứng trưởng thành, thời điểm thích hợp và vị trí chính xác trong đường sinh sản của con cái. Mặc dù AI được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi, nhưng cần nghiên cứu thêm để cải thiện tỷ lệ thành công của nó ở động vật đồng hành và các loài có nguy cơ tuyệt chủng.

Thỏ đen địa phương là một giống thỏ ta có nguồn gốc ở Việt Nam, có sức chống chịu với bệnh tật tốt, thích nghi tốt với điều kiện nuôi dưỡng thấp, khí hậu ở các vùng trong cả nước Việt Nam (Nguyễn Văn Thu, Nguyễn Thị Kim Đông, 2009). Đây là nguồn gen quý cần được bảo tồn.

Với sự phát triển nhanh chóng trong lĩnh vực gieo tinh nhân tạo trên thỏ, cần có các phương pháp tiếp cận bảo quản lông tinh trùng hiệu quả là cần thiết. Nguồn carbon đóng vai trò quan trọng trong môi trường bảo quản vì nó cung cấp năng lượng cho tế bào sinh dục đực sử dụng trong quá trình bảo quản và cân bằng thẩm thấu; trong đó, glucose, fructose và sucrose là những phân tử đường được sử dụng phổ biến trong bảo quản tinh trùng (Duy *et al.*, 2024). Đã có nhiều nghiên cứu để cải thiện môi trường bảo quản tinh dịch thỏ, tuy nhiên nghiên cứu về nguồn carbon trong môi trường bảo quản đến nay vẫn còn hạn chế. Riêng nghiên cứu trên đối tượng thỏ đen bản địa Việt Nam hiện tại còn rất mới, ở mỗi giống sẽ có nhu cầu sử dụng môi trường bảo quản là khác nhau. Mục đích chính của nghiên cứu là khảo sát ảnh hưởng của nguồn carbon trong bảo quản đến chất lượng tinh trùng thỏ đen bản địa Việt Nam từ đó có thể chọn lựa được môi trường tối ưu.

## NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu nghiên cứu

Tổng cộng có 6 con thỏ đen bản địa có độ tuổi từ 12-18 tháng và nặng từ 2,5-3,5 kg từ các vùng khác nhau của Đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam. Thỏ được tập trung tại Trang trại chăn nuôi thí nghiệm của Phòng thí nghiệm Tế bào gốc, Trường Đại học Cần Thơ và đưa vào nghiên cứu. Thỏ được nhốt riêng trong các lồng sắt

sàn phẳng, chuồng nuôi thoáng mát với nhiệt độ khoảng 28-30°C và được cung cấp đủ nước uống. Khẩu phần ăn của thỏ được xây dựng nhằm đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng của thỏ được trưởng thành (NRC, 1977) bao gồm bã đậu nành, thức ăn hỗn hợp và cỏ được tính dựa vào khối lượng vật chất khô tiêu thụ ở mỗi độ tuổi cụ thể. Tất cả vật nuôi đều được tiêm phòng đầy đủ các bệnh tan máu, myxomatosis và cầu trùng.

Tinh dịch được thu thập với tần suất hai lần một tuần bằng cách sử dụng âm đạo nhân tạo được làm ấm ở nhiệt độ 40–42°C. Âm đạo được bôi trơn bằng gel và thỏ cái được đặt trong chuồng thỏ đực, người thu mẫu cảm âm đạo nhân tạo có ống lấy tinh giữa hai chân sau của thỏ đực để lấy tinh dịch khi thỏ đực xuất tinh vào âm đạo nhân tạo. Tinh dịch có nhiễm nước tiểu đã bị loại khỏi nghiên cứu.

### Thiết kế thí nghiệm

Nghiên cứu được thực hiện trên 6 cá thể thỏ đực được chọn hoàn toàn ngẫu nhiên khỏe mạnh, mỗi cá thể thỏ đực thu mẫu 3 lần, mẫu tinh dịch của mỗi cá thể được thực hiện riêng biệt. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với nhân tố khảo sát là 3 loại đường gồm 6 nghiệm thức tương ứng mỗi loại đường 2 mức nồng độ Tris Citrate Glucose 47 mM (TCG1), Tris Citrate Glucose 69 mM (TCG2), Tris Citrate Fructose 47 mM (TCF1), Tris Citrate Fructose 56 mM (TCF2), Tris Citrate Sucrose 25 mM (TCS1), Tris Citrate Sucrose 29 mM (TCS2) (Bảng 1). Mỗi nghiệm thức lặp lại 18 lần ở điều kiện bảo quản nhiệt độ 15°C với các mốc thời gian 0 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 24 giờ 48 giờ và 72 giờ.

**Bảng 1. Thành phần hóa chất cần pha ở mỗi nồng độ khác nhau với thể tích là 100 mL (Duy et al., 2024)**

Môi trường	Tris(hydroxymethyl)aminomethane (g)	Citric acid (g)	Nguồn Carbon (g)	Gentamycin (µL)	Nước cất
TCG-1	3,03	1,69	Glucose: 0,85	200µL	Đến 100mL
TCG-2	3,03	1,48	Glucose: 1,25	200µL	Đến 100mL
TCF-1	3,03	1,69	Fructose: 0,85	200µL	Đến 100mL
TCF-2	3,03	1,48	Fructose: 1,25	200µL	Đến 100mL
TCS-1	3,03	1,69	Sucrose: 0,85	200µL	Đến 100mL
TCS-2	3,03	1,48	Sucrose: 1,25	200µL	Đến 100mL

*TCF (Tris Citrate Fructose), TCG (Tris Citrate Glucose), TCS (Tris Citrate Sucrose).*

Các nghiệm thức sẽ được đánh giá các chỉ tiêu về chất lượng tinh trùng: nồng độ, tỷ lệ sống, tỷ lệ di động, di động tổng số, di động tiến tới, tỷ lệ toàn vẹn màng.

### Đánh giá nồng độ tinh trùng

Hút 9 µL mẫu vào 2 phía của buồng đếm hồng cầu Neubauer cải tiến. Cố định buồng đếm 4 phút ở nhiệt độ phòng. Quan sát và đánh giá dưới kính hiển vi có độ phóng đại 40X. Đếm ít nhất 200 tinh trùng trên mỗi buồng đếm. Lưu ý chỉ đếm tinh trùng ngay lập tức (có đầy đủ đầu và đuôi).

$$\text{- Nồng độ tinh trùng (tế bào/mL)} = \frac{\text{Tổng số tinh trùng đếm được ở 2 buồng}}{\text{Hệ số điều chỉnh}} \times 10^6$$

### Đánh giá tỷ lệ di động của tinh trùng

Mẫu được xem dưới kính hiển vi với độ phóng đại 40X, sự di động của tinh trùng được đánh giá và phân loại như sau:

- Di động tiến tới: Tinh trùng bơi và di chuyển khắp nơi trong thị trường.
- Di động tại chỗ: Tinh trùng cử động nhưng không bơi, chỉ ở một vị trí cố định.
- Bất động: Tinh trùng nằm im, không cử động.

Số lượng tinh trùng di động theo từng loại được đếm trực quan và tỷ lệ di động từng loại được tính như sau:

$$\text{- Tỷ lệ tinh trùng di động từng loại (\%)} = \frac{\text{Số tinh trùng di động theo phân loại}}{\text{Tổng số tinh trùng đếm được}} \times 100$$

$$\text{- Tỷ lệ di động tổng số} = \text{Tỷ lệ di động tiến tới} + \text{Tỷ lệ di động tại chỗ}$$

### Đánh giá tỷ lệ sống của tinh trùng

Khả năng sống của tinh trùng được kiểm tra bằng phương pháp nhuộm Eosin-Nigrosin. Tinh trùng chết sẽ bắt màu thuốc nhuộm, trong khi tinh trùng sống thì không bắt màu (Hình 1).

$$\text{Tỷ lệ sống của tinh trùng (\%)} = \frac{\text{Số tinh trùng sống}}{\text{Tổng số tinh trùng đếm được}} \times 100$$



Hình 1. Tinh trùng được nhuộm Eosin-Nigrosin

Tinh trùng sống không bắt màu thuốc nhuộm (mũi tên trắng), tinh trùng chết bắt màu thuốc nhuộm (mũi tên đen). Thanh tỷ lệ = 50  $\mu$ m

### Đánh giá tính toàn vẹn màng tế bào

Tính toàn vẹn của màng tinh trùng được đánh giá bằng xét nghiệm độ trương giảm thẩm thấu (HOS). Tinh trùng có màng tế bào toàn vẹn thể hiện phản ứng cuộn tròn đuôi, trong khi tinh trùng có màng tế bào bị tổn thương thì không có phản ứng (Hình 2).

Tỷ lệ toàn vẹn màng của tinh trùng (%) =  $\frac{\text{Số tinh trùng cuộn tròn đuôi}}{\text{Tổng số tinh trùng đếm được}} \times 100$



Hình 2. Tinh trùng được xét nghiệm HOS

Tinh trùng có màng tế bào toàn vẹn thể hiện phản ứng cuộn tròn đuôi (mũi tên đỏ), tinh trùng có màng tế bào bị tổn thương thì không có phản ứng (mũi tên đen). Thanh tỷ lệ = 50  $\mu$ m

### Phân tích thống kê

Số liệu được ghi nhận bằng phần mềm Excel (2016). Mô hình hỗn hợp tuyến tính (Linear Mixed Model) ANOVA được sử dụng để phân tích dữ liệu, sau đó so sánh giá trị trung bình giữa các nghiệm thức bằng phương pháp Tukey trong phần mềm R.4.3.1. Nồng độ lòng đỏ trứng gà và thời gian bảo quản là những ảnh hưởng cố định (fixed effect), lần thu mẫu và cá thể thỏ là những ảnh hưởng ngẫu nhiên (random effect). Các kết quả được trình bày dưới dạng trung bình  $\pm$  sai số chuẩn (SE). Ý nghĩa thống kê được đặt ở  $p < 0,05$  cho thấy mức độ tin cậy cao đối với kết quả thu được.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả đánh giá tinh trùng sau thu mẫu

Yếu tố quan trọng quyết định đến chất lượng mẫu trong quá trình thí nghiệm là chất lượng tinh trùng. Sau khi thu mẫu, các mẫu tinh trùng cần được đánh giá cảm quan tại phòng thí nghiệm về thể tích, màu sắc, pH, mật số tinh trùng. Những mẫu tinh dịch đạt yêu cầu về đại thể sẽ được tiến hành thí nghiệm. Kết quả đánh giá đại thể được thể hiện tại Bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá tinh trùng sau thu mẫu

Chỉ tiêu đánh giá	Kết quả
Màu sắc	Trắng đục
pH	6,96 $\pm$ 0,03
Thể tích (ml)	0,63 $\pm$ 0,01
Nồng độ ( $\times 10^9$ tế bào/ml)	1,38 $\pm$ 0,021

Từ kết quả Bảng 2 có thể thấy, pH và thể tích trung bình các mẫu tinh dịch thỏ đen là 6,96  $\pm$  0,03 và 0,63  $\pm$  0,01 mL đạt chỉ tiêu về khảo sát đại thể. Nếu tinh dịch có pH thấp hơn hoặc cao hơn khoảng 7 đến 7,2 là tinh dịch không bình thường, không tốt cho sức sống và khả năng thụ thai của tinh trùng. Tất cả mẫu đều có màu trắng đục đặc trưng của tinh dịch thỏ. Bên cạnh đó, giá trị nồng độ tinh dịch cũng phù hợp theo nghiên cứu của Tran và đồng tác giả (2023). Từ những kết quả trên, chứng tỏ các mẫu đảm bảo đạt tiêu chuẩn về khảo sát đại thể và đồng nhất cho cả thí nghiệm.

**Kết quả khảo sát ảnh hưởng của môi trường bảo quản đến chất lượng tinh trùng thỏ đen**

Kết quả ở Bảng 3 về khả năng sống của tinh trùng trong quá trình bảo quản cho thấy quá trình bảo quản ở 15°C đã làm giảm khả năng sống của tinh trùng sau mỗi mốc thời gian bảo quản. Có thể thấy, sau 48 giờ bảo quản, tỷ lệ sống của tinh trùng vẫn phù hợp với nghiên cứu của Duy và đồng tác giả (2024). Cụ thể, môi trường TCF2 ghi nhận tỷ lệ tinh trùng sống thấp nhất với 53,16%, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với môi trường TCG2 và TCS1 cụ thể tỷ lệ sống lần lượt ở 2 môi trường là 53,74% và 53,61%, trong khi môi trường TCS2 ghi nhận tỷ lệ tinh trùng sống sót cao nhất với 62,45% giảm 23,02% so với mốc 0 giờ ở cùng môi trường bảo quản, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 3. Tỷ lệ sống (%) của tinh trùng qua các mốc thời gian khảo sát**

Mốc thời gian	Các môi trường khảo sát					
	TCG1	TCG2	TCF1	TCF2	TCS1	TCS2
0 giờ	84,34 <sup>a</sup> ±0,32	80,61 <sup>c</sup> ±0,41	82,83 <sup>b</sup> ±0,48	80,72 <sup>c</sup> ±0,23	80,75 <sup>c</sup> ±0,43	85,47 <sup>a</sup> ±0,37
6 giờ	79,33 <sup>b</sup> ±0,54	75,67 <sup>d</sup> ±0,24	77,78 <sup>c</sup> ±0,35	75,32 <sup>d</sup> ±0,20	75,27 <sup>d</sup> ±0,23	80,83 <sup>a</sup> ±0,31
12 giờ	75,61 <sup>b</sup> ±0,23	72,05 <sup>d</sup> ±0,45	73,76 <sup>c</sup> ±0,33	70,64 <sup>a</sup> ±0,31	71,05 <sup>de</sup> ±0,35	77,38 <sup>a</sup> ±0,44
24 giờ	72,33 <sup>b</sup> ±0,42	69,12 <sup>c</sup> ±0,29	66,39 <sup>d</sup> ±0,43	64,23 <sup>e</sup> ±0,36	66,94 <sup>d</sup> ±0,42	74,62 <sup>a</sup> ±0,42
48 giờ	59,11 <sup>b</sup> ±0,47	53,74 <sup>d</sup> ±0,36	56,38 <sup>c</sup> ±0,24	53,16 <sup>d</sup> ±0,45	53,61 <sup>d</sup> ±0,55	62,45 <sup>a</sup> ±0,26
72 giờ	51,38 <sup>b</sup> ±0,45	45,16 <sup>d</sup> ±0,37	48,16 <sup>c</sup> ±0,46	45,12 <sup>d</sup> ±0,28	46,26 <sup>cd</sup> ±0,25	54,22 <sup>a</sup> ±0,34

<sup>a, b, c, d</sup>Trong cùng một hàng, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

Kết quả đánh giá khả năng di động của tinh trùng trong quá trình bảo quản được thể hiện ở Bảng 4 và Bảng 5. Quá trình bảo quản có ảnh hưởng lớn đến khả năng vận động của tinh trùng thỏ đen Việt Nam. Sau thời gian bảo quản, kết quả cho thấy sự suy giảm đáng kể về khả năng vận động tổng số của tinh trùng (Bảng 4). Tỷ lệ di động của tinh trùng vẫn phù hợp theo nghiên cứu của Duy và đồng tác giả (2024) sau 48 giờ bảo quản. Cụ thể, tỷ lệ di động tổng số cao nhất được ghi nhận trên môi trường TCS2 (49,27%), trong khi độ tỷ lệ di động tổng số thấp nhất được ghi nhận trên môi trường TCF2 (41,54%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ). Kết quả từ Bảng 5 cho thấy tỷ lệ di động tiến tới của tinh trùng trong tất cả các môi trường giảm dần theo thời gian bảo quản. Sau 48 giờ bảo quản, tỷ lệ di động tiến tới của tinh trùng trong môi trường TCS2 đạt cao nhất với 30,71%, trong khi môi trường TCF2 cho thấy thấp nhất (16,21%), sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 4. Tỷ lệ (%) tổng di động của tinh trùng qua các mốc thời gian khảo sát**

Mốc thời gian	Các môi trường khảo sát					
	TCG1	TCG2	TCF1	TCF2	TCS1	TCS2
0 giờ	80,33 <sup>ab</sup> ±0,45	76,68 <sup>d</sup> ±0,56	79,07 <sup>bc</sup> ±0,24	77,16 <sup>cd</sup> ±0,25	77,35 <sup>cd</sup> ±0,41	81,81 <sup>a</sup> ±0,47
6 giờ	75,47 <sup>b</sup> ±0,32	71,51 <sup>d</sup> ±0,37	73,48 <sup>c</sup> ±0,35	70,94 <sup>d</sup> ±0,41	70,83 <sup>d</sup> ±0,44	77,72 <sup>a</sup> ±0,32
12 giờ	70,12 <sup>b</sup> ±0,43	66,12 <sup>d</sup> ±0,38	68,38 <sup>c</sup> ±0,37	65,56 <sup>d</sup> ±0,29	65,33 <sup>d</sup> ±0,34	72,61 <sup>a</sup> ±0,43
24 giờ	59,94 <sup>b</sup> ±0,52	56,88 <sup>d</sup> ±0,24	58,38 <sup>c</sup> ±0,43	60,89 <sup>b</sup> ±0,21	56,16 <sup>d</sup> ±0,37	62,05 <sup>a</sup> ±0,54
48 giờ	46,05 <sup>b</sup> ±0,38	42,27 <sup>d</sup> ±0,33	44,05 <sup>c</sup> ±0,31	41,54 <sup>d</sup> ±0,35	41,78 <sup>d</sup> ±0,43	49,27 <sup>a</sup> ±0,51
72 giờ	41,32 <sup>b</sup> ±0,28	35,81 <sup>d</sup> ±0,36	38,69 <sup>c</sup> ±0,46	34,88 <sup>d</sup> ±0,47	36,20 <sup>d</sup> ±0,32	43,72 <sup>a</sup> ±0,46

<sup>a, b, c, d</sup>Trong cùng một hàng, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 5. Tỷ lệ (%) di động tiến tới của tinh trùng qua các mốc thời gian khảo sát**

Mốc thời gian	Các môi trường khảo sát					
	TCG1	TCG2	TCF1	TCF2	TCS1	TCS2
0 giờ	63,33 <sup>b</sup> ±0,53	56,38 <sup>d</sup> ±0,51	58,06 <sup>c</sup> ±0,47	54,66 <sup>d</sup> ±0,54	56,50 <sup>d</sup> ±0,51	67,35 <sup>a</sup> ±0,52
6 giờ	57,88 <sup>b</sup> ±0,37	52,72 <sup>d</sup> ±0,42	55,05 <sup>c</sup> ±0,32	50,72 <sup>d</sup> ±0,40	51,71 <sup>d</sup> ±0,43	61,27 <sup>a</sup> ±0,45
12 giờ	51,54 <sup>b</sup> ±0,31	43,94 <sup>c</sup> ±0,31	48,77 <sup>b</sup> ±0,31	44,15 <sup>c</sup> ±0,29	44,38 <sup>c</sup> ±0,47	57,83 <sup>a</sup> ±0,32
24 giờ	39,27 <sup>c</sup> ±0,49	34,05 <sup>cd</sup> ±0,33	36,61 <sup>bc</sup> ±0,33	33,27 <sup>d</sup> ±0,28	42,78 <sup>ab</sup> ±0,23	44,39 <sup>a</sup> ±0,44

## CÔNG NGHỆ TẾ BÀO

48 giờ	24,11 <sup>b</sup> ±0,23	18,37 <sup>c</sup> ±0,29	18,47 <sup>c</sup> ±0,42	16,21 <sup>c</sup> ±0,32	17,05 <sup>c</sup> ±0,20	30,71 <sup>a</sup> ±0,25
72 giờ	15,16 <sup>a</sup> ±0,55	9,98 <sup>b</sup> ±0,28	9,54 <sup>b</sup> ±0,38	7,40 <sup>c</sup> ±0,35	8,13 <sup>b</sup> ±0,31	14,38 <sup>a</sup> ±0,36

*a, b, c, d* Trong cùng một hàng, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

Bảng 6 trình bày kết quả đánh giá tính toàn vẹn của màng tinh trùng trong quá trình bảo quản. Sự suy giảm đáng kể về tính toàn vẹn của màng tinh trùng đã được ghi nhận trong quá trình bảo quản. Sau 48 giờ bảo quản, tỷ lệ toàn vẹn màng tinh trùng vẫn phù hợp với nghiên cứu của Duy và đồng tác giả (2024). Cụ thể, môi trường TCS2 ghi nhận tỷ lệ toàn vẹn màng tinh trùng cao nhất với 30,71%, trong khi môi trường TCS2 ghi nhận tỷ lệ tinh trùng sống thấp nhất với 16,21%, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

**Bảng 6. Tỷ lệ (%) toàn vẹn màng của tinh trùng qua các mốc thời gian khảo sát**

Mốc thời gian	Các môi trường khảo sát					
	TCG1	TCG2	TCF1	TCF2	TCS1	TCS2
0 giờ	62,27 <sup>b</sup> ±0,34	59,82 <sup>cd</sup> ±0,53	61,33 <sup>bc</sup> ±0,46	59,27 <sup>d</sup> ±0,54	59,66 <sup>cd</sup> ±0,54	64,44 <sup>a</sup> ±0,36
6 giờ	58,24 <sup>b</sup> ±0,42	54,83 <sup>d</sup> ±0,44	56,33 <sup>c</sup> ±0,38	54,27 <sup>d</sup> ±0,33	54,21 <sup>d</sup> ±0,34	60,67 <sup>a</sup> ±0,44
12 giờ	52,85 <sup>ab</sup> ±0,45	48,87 <sup>c</sup> ±0,47	51,17 <sup>bc</sup> ±0,48	49,67 <sup>c</sup> ±0,45	49,78 <sup>c</sup> ±0,52	54,22 <sup>a</sup> ±0,46
24 giờ	43,14 <sup>ab</sup> ±0,24	39,61 <sup>c</sup> ±0,55	41,50 <sup>bc</sup> ±0,35	39,67 <sup>c</sup> ±0,41	39,78 <sup>c</sup> ±0,26	45,68 <sup>a</sup> ±0,24
48 giờ	41,83 <sup>b</sup> ±0,53	37,11 <sup>c</sup> ±0,46	39,06 <sup>bc</sup> ±0,37	37,17 <sup>c</sup> ±0,32	37,06 <sup>c</sup> ±0,24	44,32 <sup>a</sup> ±0,38
72 giờ	39,41 <sup>b</sup> ±0,34	34,50 <sup>d</sup> ±0,34	36,22 <sup>c</sup> ±0,28	34,77 <sup>d</sup> ±0,25	35,11 <sup>d</sup> ±0,35	43,11 <sup>a</sup> ±0,34

*a, b, c, d* Trong cùng một hàng, các giá trị có ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ).

### THẢO LUẬN

Nhìn chung, chất lượng tinh thỏ giảm dần theo thời gian bảo quản, nghiên cứu đánh giá ảnh hưởng của các nguồn carbon và nồng độ của chúng đến thời gian bảo quản cũng như chất lượng tinh dịch. Với các nồng độ khác nhau và các loại đường khác nhau dẫn đến ảnh hưởng chất lượng tinh thỏ theo thời gian bảo quản ở 15°C. Kết quả cho thấy môi trường bảo quản TCS2 có nồng độ đường sucrose cho kết quả tích cực nhất có thể giúp cải thiện chất lượng tinh trùng sau bảo quản và có khác biệt ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Nồng độ sucrose 29 mM được chọn là nồng độ tối ưu nhất trong nghiên cứu, khi giảm nồng độ sucrose còn 25 mM thì các chỉ tiêu đều giảm rõ rệt. Điều này chứng tỏ khi giảm nồng độ sucrose sẽ gây ảnh hưởng xấu đến tinh trùng thỏ. Cụ thể sau 24 giờ bảo quản, tỷ lệ di động tổng số của tinh trùng ở môi trường TCF1 là 58,38%, kết quả này tốt hơn kết quả nghiên cứu của Gororo và đồng tác giả (2019) khi nghiên cứu ảnh hưởng của các chất bảo quản khác nhau và nhiệt độ bảo quản đến chất lượng của tinh dịch dê nhỏ Đông Phi. Kết quả nghiên cứu cho thấy khả năng di động tổng số của tinh trùng trong môi trường TCF cho kết quả tốt. Tương tự, kết quả nghiên cứu của Gororo và đồng tác giả (2019) khi cho thấy tỷ lệ di động tổng số của tinh trùng ở môi trường TCF cao hơn và khác biệt có ý nghĩa so với tỷ lệ di động tổng số của tinh trùng ở môi trường TCC ( $P < 0,05$ ). Đối với môi trường sử dụng sucrose làm nguồn carbon (TCS1 và TCS2), ở tất cả các mốc thời gian, môi trường TCS2 là môi trường cho kết quả tinh trùng có chất lượng tốt nhất trong 6 loại môi trường được khảo sát. Kết quả từ nghiên cứu này cho thấy đường sucrose mang lại những ảnh hưởng tích cực tốt hơn so với hai loại đường còn lại (glucose và fructose) trong việc bảo quản tinh trùng dạng lỏng. Điều này phù hợp với kết quả của Duy và đồng tác giả (2024) khi cho thấy sucrose bảo quản lỏng tinh trùng dê tốt hơn glucose và fructose. Đường được biết là nguồn carbon cung cấp năng lượng và duy trì sức sống của tinh trùng, môi trường bảo quản được tạo ra từ 3 loại đường khác nhau (fructose, glucose và sucrose) với các nồng độ khác nhau cho kết quả chất lượng tinh dịch khác nhau. Fructose và glucose là một monosaccharide, trong khi đó sucrose là disaccharide và 3 loại đường này khác nhau về kích thước. Chất tan trong môi trường bảo quản dựa trên fructose và glucose khác với môi trường dựa trên sucrose do sự khác biệt về kích thước và trọng lượng phân tử. Sự khác biệt này có thể ảnh hưởng đến dòng chảy vào màng do đó biến đổi phản ứng của tế bào tinh trùng. Ở nghiên cứu của Ruff và đồng tác giả (2015) cũng cho thấy đường sucrose tốt hơn đường fructose và glucose đối với tuổi thọ, khả năng sinh sản và sự thống trị xã hội của chuột cái.

Hai con đường trao đổi chất tạo ra adenosine triphosphate (ATP), cung cấp năng lượng cho các chức năng chính của tinh trùng là quá trình phosphoryl hóa oxy hóa và đường phân. Quá trình đường phân xảy ra trong tế bào

chất của tế bào tinh trùng và cung cấp năng lượng cho quá trình trao đổi chất của tinh trùng (Du-Plessis *et al.*, 2015). Đường fructose và glucose được coi là nguồn năng lượng chính trong tế bào tinh trùng. Trong quá trình bảo quản lỏng tinh trùng, tinh trùng có nguy cơ bị oxy hóa do tích tụ ROS (Domoslawska *et al.*, 2018). ROS quá mức làm hỏng protein tế bào và cấu trúc lipid của màng tế bào, hơn nữa ROS quá mức gây đột biến gen và đẩy nhanh quá trình chết tế bào. Khả năng di chuyển của tinh trùng và tính toàn vẹn của màng tế bào tinh trùng rất quan trọng đối với phản ứng của acrosome và sự thâm nhập sâu hơn qua màng trong của noãn (Ren *et al.*, 2019). Ty thể đóng một vai trò quan trọng trong việc duy trì chức năng bình thường của tinh trùng và cân bằng năng lượng nội môi thông qua quá trình phosphoryl hóa oxy hóa và ATP synthase (Zhao *et al.*, 2014). Kết quả nghiên cứu có thể trở thành cơ sở và nền tảng cho những nghiên cứu chuyên sâu sau này trong việc ứng dụng kỹ thuật bảo quản tinh trùng thể dạng lỏng sử dụng cho gieo tinh nhân tạo. Môi trường bảo quản tinh trùng thể dạng lỏng ngày càng được cải thiện. Dựa vào kết quả nghiên cứu, sucrose có thể trở thành một trong những nguồn carbon hữu ích thay thế glucose và fructose trong việc bảo quản tinh trùng dạng lỏng nhờ những tác động tích cực mà nó mang lại. Nghiên cứu đã cung cấp một cái nhìn tổng thể về những tác động này, từ đó giúp nhìn thấy rõ hơn về vai trò của nguồn carbon trong môi trường và thời gian bảo quản đến khả năng vận động, tỷ lệ sống và tính toàn vẹn màng tế bào của tinh trùng thể. Nghiên cứu đã tìm ra một phát hiện mới, một ứng dụng mới của sucrose trong bảo quản tinh trùng thể dạng lỏng.

## KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy khả năng bảo quản tinh dịch của các 3 nguồn carbon (glucose, fructose và sucrose) trong môi trường bảo quản tinh trùng lỏng là khác nhau. Môi trường Tris Citrate Sucrose 29 mM giúp tinh trùng giữ được chất lượng tốt nhất trong quá trình bảo quản ở 15°C và thời gian bảo quản thích hợp đến 48 giờ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Barbas JP, Mascarenhas RD (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*, 10: 49-62.
- Domoslawska A, Zdunczyk S, Franczyk M, Kankofer M, Janowski T (2018). Selenium and vitamin E supplementation enhances the antioxidant status of spermatozoa and improves semen quality in male dogs with lowered fertility. *Andrologia*, 50(6): e13023.
- Du-Plessis SS, Agarwal A, Mohanty G, Van DLM (2015). Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?. *Asian journal of andrology*, 17(2): 230-235.
- Duy NLK, Liem BT, Vy NPN, Khuong TTT (2024). Effects of storage medium and storage time on the goat spermatozoa quality. *TNU Journal of Science and Technology*, 229(05): 227 – 234.
- Gororo E, Zulu PT, Chatiza FP, Mhuka C (2019). Effects of different extenders and storage temperatures on longevity of small East African goat (*Capra hircus*) semen. *Small Ruminant Research*, 175: 83-89.
- NRC (1977). Nutrient Requirements of Rabbits, 2<sup>th</sup> ed. *National Academy of Sciences*. Washington DC, US.
- Ombelet W, Van RJ (2015). Artificial insemination history: hurdles and milestones. *Facts, views & vision in ObGyn*, 7(2): 137-143.
- Parkinson TJ and Morrell JM (2019). Advantages and disadvantages of artificial insemination. *Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 10th ed. *WB Saunders, Philadelphia, US*
- Ruff JS, Hugentoble SA, Suchy AK, Sosa MM, Tanner RE, HiteME, Potts WK (2015). Compared to sucrose, previous consumption of fructose and glucose monosaccharides reduces survival and fitness of female mice. *The Journal of nutrition*, 145(3): 434-441.
- Nguyễn Văn Thu, Nguyễn Thị Kim Đông (2009). Giáo trình chăn nuôi thỏ. Khoa Chăn nuôi, Trường Nông Nghiệp, Đại Học Cần Thơ, Thành phố Cần Thơ.
- Tran TTK, Duy NLK, Hang NT, Ngoc PK, Tuyen DND (2023). Improving indigenous Vietnamese Black Rabbit frozen sperm quality: the role of glycine and sperm selection methods. *World Rabbit Science*, 31(4): 229-236.
- Zhao J, Zhang Q, Wang Y, Li Y (2014). Whether sperm deoxyribonucleic acid fragmentation has an effect on pregnancy and miscarriage after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a systematic review and meta-analysis. *Fertility and sterility*, 102(4): 998-1005.
- Sharma P, Arya D, Arya A, Doultani S, Hadiya KK, George LB, Highland HN (2024). An Overview of Artificial Insemination: A Journey from Past to Present. *Journal of Scientific Research and Reports*, 30(6): 449-458.

## EFFECT OF CARBON SOURCE ON THE QUALITY OF VIETNAMESE BLACK RABBIT SPERM IN LIQUID STORAGE

Tran Thi Thanh Khuong\*, Nguyen Lam Khanh Duy

*Stem cell laboratory, Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University*

### SUMMARY

Liquid storage medium and storage time play an important role in maintaining and stabilizing sperm quality. The goal of the study is to determine the appropriate carbon source and optimal time to best preserve Vietnamese black rabbit sperm. The study evaluated the role of three different carbon sources in the storage medium: glucose, fructose and sucrose. The experiment was designed to include 6 treatments corresponding to 6 types of storage environments, each treatment was repeated 6 times. After being collected, the semen sample was diluted with storage medium at a ratio of 1:10, then stored at a temperature of 15°C. The quality assessment is based on specific time points: 0 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 48 hours and 72 hours. Research results showed that sperm quality gradually decreases with storage time. Microscopic evaluation results showed that rabbit sperm achieved the best quality when using Tris Citrate Sucrose 29 mM medium after 48 hours of storage, specifically the overall motility rate was 49.27%, the progressive motility rate was 30.71%, viability rate was 62.45% and sperm membrane integrity rate was 44.32%. This study showed that sperm quality gradually decreases with storage time and medium. Tris Citrate Sucrose 29 mM preserves sperm samples with the best effectiveness after 48 hours of storage.

*Keywords:* Liquid storage, carbon source, sperm, Vietnamese black rabbit, Tris Citrate Glucose.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0901.002.285; Email: tttkhuong@ctu.edu.vn