

ĐÔNG LẠNH NHANH TINH GÀ ĐÔNG TẢO

Ngô Thành Trung^{1*}, Trần Thị Chi¹, Nguyễn Thị Hà¹,
Nguyễn Đức Trường², Nguyễn Văn Thanh²

¹*Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

²*Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

Email*: nttrungcnshhua@gmail.com

Ngày gửi bài: 18.04.2017

Ngày chấp nhận: 26.07.2017

TÓM TẮT

Nghiên cứu thử nghiệm áp dụng kỹ thuật đông lạnh tinh trùng (gọi tắt là tinh) và thụ tinh nhân tạo nhằm bảo tồn và phát triển giống gà Đông Tảo. Nghiên cứu gồm 3 thí nghiệm: (i) Đánh giá chất lượng tinh gà trống Đông Tảo vào 2 mùa nóng, lạnh; (ii) So sánh hiệu quả bảo tồn đông lạnh dạng cọng rạ (1 ml; 0,25 ml) và dạng viên của tinh gà Đông Tảo; (iii) Đánh giá hiệu quả dẫn tinh bằng tinh đông lạnh. Sử dụng 6 gà trống và 48 gà mái Đông Tảo (10 - 14 tháng tuổi), kết quả cho thấy chất lượng tinh nguyên của gà Đông Tảo là khá tốt và có sự thay đổi theo mùa (mùa nóng tốt hơn mùa lạnh). Nghiên cứu đã đông lạnh thành công tinh gà Đông Tảo ở cả 2 dạng cọng rạ (0,25 ml, 1 ml) và dạng viên, trong đó, dạng cọng rạ cho kết quả tốt hơn dạng viên. Ngoài ra, cọng rạ loại 1 ml cho kết quả tốt hơn cọng rạ loại 0,25 ml (cụ thể, hoạt lực sau giải đông thấp nhất cũng đạt trên 30%, tỷ lệ tinh trùng sống trên 40% và tỷ lệ tinh trùng kỳ hình dưới 30%). Kết quả dẫn tinh cho thấy tinh cọng rạ 1 ml cho tỷ lệ trứng có phôi cao nhất (70%), gần tương đương với lô đối chứng nhảy trực tiếp.

Từ khóa: Đông lạnh tinh trùng, gà Đông Tảo, thụ tinh nhân tạo.

Fast Freezing Cryopreservation of Dong Tao Chicken Sperms

ABSTRACT

A study on sperm cryopreservation and artificial insemination of Dong Tao chicken breed was conducted. Three experiments were carried out (1) Assessment of semen parameters of Dong Tao cocks in hot and cold seasons; (2) Comparison of efficiency of cryopreservation of Dong Tao chicken sperm using rice straws (0.25 and 1.00 ml) and pellets; and (3) Evaluation of insemination efficiency of Dong Tao hens by cryopreserved sperms. Six Dong Tao cocks and 48 Dong Tao hens (10 - 14 months old) were used in this experiment. The results showed that Dong Tao cock's semen quality was good and better in hot season compared to cold season. Sperm cryopreservation in cryo - straw forms was better than in cryovial form. Thawed sperm quality parameters of 1 ml cryo - straw sperm samples were better than in 0.25 ml cryo - straw sperm samples. Artificial insemination with thawed sperms from 1 ml cryo - straw samples yielded highest percentage of fertilized eggs (70%), equal to natural insemination.

Keywords: Artificial insemination, Dong Tao chicken breed, sperm cryopreservation.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kỹ thuật thụ tinh nhân tạo nói chung cũng như thụ tinh nhân tạo cho tạo gia cầm nói riêng đã được nghiên cứu và áp dụng rộng rãi trên toàn thế giới. Do đó, tinh dịch (gọi tắt là "tinh") gia cầm được đông lạnh bảo tồn lâu dài ngoài cơ

thể (*ex situ*) để có thể sử dụng bất cứ ở đâu và lúc nào. Trên thế giới, kỹ thuật đông lạnh tinh dịch gà đã được ứng dụng thành công trong sản xuất, nhất là bảo tồn nguồn gen những giống gà quý hiếm. Gà Đông Tảo có nguồn gốc từ xã Đông Tảo, huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên. Trong những năm gần đây, gà Đông Tảo được phát

triển mạnh mẽ về số lượng gà, đàn gà thuần bị lai tạp và bị cận huyết, nguy cơ mất dần gà Đông Tảo thuần đang hiện hữu. Theo Nguyễn Đăng Vang (1999), quần thể gà nhỏ hẹp và việc giao phối gà không có kiểm soát dẫn đến tỉ lệ cận huyết ở gà Đông Tảo cao (0,099). Đã có rất nhiều công trình nghiên cứu và bảo tồn về giống gà này như chương trình “Bảo tồn quỹ gen vật nuôi” từ những năm 1992 của Viện Chăn nuôi (Lê Thị Thu Hiền và cs., 2014), “Khả năng sản xuất của gà Đông Tảo nuôi tại Thụy Phương” (Nguyễn Đăng Vang, 1999). Thụ tinh nhân tạo với ưu thế có thể khắc phục những nhược điểm của phối giống tự nhiên, giúp nhân nhanh đàn gà thuần và quản lý giống dễ dàng hơn nên nghiên cứu đông lạnh nhanh tinh gà Đông Tảo muốn thông qua (i) Đánh giá chất lượng tinh gà Đông Tảo theo mùa (nóng, lạnh); (ii) Đánh giá hiệu quả bảo tồn tinh gà Đông Tảo bằng kỹ thuật đông lạnh nhanh dạng cọng rạ và dạng viên; và (iii) Đánh giá hiệu quả dẫn tinh bằng tinh đông lạnh gà Đông Tảo để (i) Chọn được ít nhất 3 cá thể gà trống Đông Tảo có chất lượng tinh tốt; (ii) Xác định được phương pháp đông lạnh tinh thích hợp để sau giải đông, hoạt lực tinh trùng trên 0,3 điểm (tương đương 25 - 35% số tinh trùng còn hoạt lực tiến thẳng); và (iii) Xác định được tỷ lệ trứng có phôi sau phối tinh bằng tinh đông lạnh gà Đông Tảo.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

- Từ 20 gà trống giống tại xã Đông Tảo, huyện Khoái Châu, tỉnh Hưng Yên (có ngoại hình đặc trưng của giống) mang về nuôi tại Trại thực nghiệm động vật, Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam, qua hai lần tuyển chọn, 6 gà trống giống có chất lượng tinh tốt nhất được dùng cho thí nghiệm. Những gà trống này (10 - 14 tháng tuổi) được nuôi thích nghi 1 tháng trước khi thí nghiệm. Gà có sức khỏe tốt (đã được tiêm phòng và tẩy nội ngoại ký sinh trùng theo quy định của thú y), dạn người, được nuôi riêng từng ô (cách ly với

những gà trống khác) và bên cạnh ô những gà mái khác (để duy trì tính hằng), cùng một chế độ ăn uống và chăm sóc. Chuồng nuôi thoáng đảng và không thay đổi nhiệt độ đột ngột (Đào Đức Thà, 2006).

- Gà mái Đông Tảo (10 - 14 tháng tuổi) bao gồm 42 con có sức khỏe tốt, ngoại hình đặc trưng, khả năng sinh sản bình thường, được nuôi riêng từng ô, cùng một chế độ ăn uống và chăm sóc.

2.2. Dụng cụ và hóa chất thí nghiệm

- Hóa chất: Môi trường pha loãng tinh gà Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE; Minitüb, CHLB Đức), nước cất, NaCl, Formol citrate, lòng đỏ trứng gà, Glycerol;

- Dụng cụ: Kính hiển vi quang học, buồng đếm hồng bạch cầu, tủ bảo ôn, máy đo pH, micropipette, đĩa ấm, bể ổn nhiệt, tủ sấy, cân kỹ thuật và cân phân tích, máy khuấy từ, lam kính, lamén, giấy lau, ống Eppendorf, ống đông, cốc đông, pipet thủy tinh 5 và 10 ml, ống bóp cao su, thùng đông lạnh tinh, bình ni tơ lỏng, bình chứa mẫu tinh trong ni tơ lỏng, cọng rạ 0,25; 1 ml và ống đông lạnh 2 ml (để chứa tinh dạng viên) của công ty Guangxi Jiangs Animal Products Co. Ltd., Trung Quốc.

2.3. Thời gian và địa điểm

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 5/2015 đến tháng 3/2016 tại Trại thực nghiệm động vật, Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Khai thác tinh gà

Áp dụng phương pháp lấy tinh gà của Đào Đức Thà (2006): Người thứ nhất dùng tay trái giữ 2 chân gà trống, tay phải miết (mát xa) dọc theo bụng và hai bên đùi gà trống xuôi xuống phía đuôi. Khi gà trống hưng phấn, dùng ngón cái và ngón trỏ tay phải nhẹ nhàng ép miệng lỗ huyết. Cùng lúc đó người thứ hai vén ngược đuôi gà lên phía trên để lộ lỗ huyết (tạo điều kiện lấy tinh được dễ dàng) và hứng tinh (không cho chất

thải phóng vào cốc hứng tinh). Thời gian mát xa để gà trống có phản xạ xuất tinh khoảng 30 giây đến một phút. Gà trống sau khi tách khỏi đàn mái 3 - 4 ngày đã có thể lấy được tinh (80 - 85% số con có thể xuất tinh ngay từ lần luyện đầu tiên). Tần suất lấy tinh 1 lần/ngày, lặp lại ít nhất 6 lần/cá thể/mùa. Thời điểm theo dõi: tháng 5 - 10/2015 (nóng) và tháng 11/2015 - 3/2016 (lạnh).

2.4.2. Đánh giá chất lượng tinh nguyên

Chất lượng tinh nguyên được đánh giá theo từng lần khai thác của từng cá thể, các mẫu tinh không trộn lẫn. Chỉ tiêu theo dõi gồm: (i) Lượng xuất tinh (V, ml): được xác định bằng phễu hứng tinh có chia vạch; (ii) Hoạt lực tinh trùng tiến thẳng (A, điểm): được xác định theo Đào Đức Thà (2006): nhỏ 3 giọt tinh nguyên lên lam kính, quan sát trên kính hiển vi, ước lượng tỷ lệ tinh trùng tiến thẳng. Lấy trung bình hoạt lực quan sát được từ 3 giọt tinh trên lam kính; (iii) Nồng độ tinh trùng (C, tỷ/ml): Áp dụng phương pháp Waberski (2004) (dẫn theo Ngo, 2010): dùng micropipette hút 5 μ l tinh nguyên trộn đều trong 9.995 μ l NaCl 10% trong ống Fancol 10 ml, lắc đều, đưa dung dịch vào 2 phía của buồng đếm Neubauer (có đặt lamên dùng cho buồng đếm), đưa lên kính hiển vi đếm số lượng tinh trùng có trong 80 ô con rồi tính nồng độ tinh trùng; (iv) Tỷ lệ tinh trùng sống (%): Áp dụng phương pháp của Đào Đức Thà (2006) theo nguyên lý: tinh trùng chết khi nhuộm sẽ bắt màu của thuốc nhuộm, tinh trùng sống sẽ không bắt màu thuốc nhuộm. Cách tiến hành: Lấy 1 phiến kính khô, sạch. Nhỏ một giọt tinh mới lấy lên lam kính. Nhỏ 1 - 2 giọt dung dịch Eosin 5% bên cạnh giọt tinh. Dùng đũa thủy tinh trộn đều và phiết tiêu bản. Sau đó, đưa lên quan sát trên kính hiển vi ở độ phóng đại 400 - 600 lần. Những tinh trùng bắt màu đỏ hồng của Eosin là tinh trùng đã chết còn tinh trùng không bị nhuộm màu là tinh trùng sống. Đếm tổng số 400 tinh trùng (cả sống và chết) cho một mẫu và xác định tỷ lệ% tinh trùng sống; (v) Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%): Theo phương pháp Waberski (2004); dẫn theo Ngo, 2010): Làm tiêu bản cố định và quan sát trên kính hiển vi với độ phóng

đại 1.000 lần. Cho 10 μ l tinh pha vào ống Eppendorf có chứa 700 μ l dung dịch Formol citrate 4%. Dùng lam kính sạch, sấy khô, nhỏ một giọt tinh pha đã được cố định lên lam. Dùng lamên sạch, trong, đã sấy khô đặt nghiêng từ từ lên phần lam kính có chứa giọt tinh pha sao cho tiêu bản được cố định mà không có bọt khí. Phần dung dịch thừa được thấm hết bằng giấy thấm. Đưa tiêu bản đã cố định lên quan sát trên kính hiển vi. Đếm tổng số 400 tinh trùng (cả bình thường và kỳ hình) cho một mẫu và xác định tỷ lệ% tinh trùng kỳ hình.

2.4.3. Đông lạnh và giải đông tinh gà

- Đông lạnh tinh gà: Các mẫu tinh gà nếu đạt $A \geq 70\%$ và tỷ lệ kỳ hình $\leq 15\%$ mới được đưa vào đông lạnh (Ehling *et al.*, 2012; Hanzawa *et al.*, 2010); Môi trường đông lạnh (BPSE) bổ sung 20% lòng đỏ trứng gà và 6% Glycerol (Giesen, 1983). Tỷ lệ pha loãng: 1 thể tích tinh + 9 thể tích môi trường (Phillips *et al.*, 1996; Hanzawa *et al.*, 2010; Ehling *et al.*, 2012) và tính toán sao cho mỗi liều tinh đạt 100 - 200 triệu tinh trùng/liều dẫn tinh đối với tinh đông lạnh (Phillips *et al.*, 1996). Tinh gà được pha loãng trong cùng môi trường BPSE, sau đó mới chia vào cọng rạ hoặc tạo viên.

Đông lạnh dạng cọng rạ 0,25ml và 1 ml, gồm 4 bước (Ehling, 2012): Bước 1: Các mẫu tinh của từng cá thể được pha loãng trong môi trường BPSE theo tỷ lệ 1:1 ở nhiệt độ phòng. Bước 2: Cân bằng ở 5°C trong 60 phút. Bước 3: pha loãng tinh lần hai với môi trường BPSE chứa lòng đỏ trứng và glycerol để đạt tỷ lệ pha loãng 1 thể tích tinh nguyên + 9 thể tích môi trường, lượng lòng đỏ trứng gà cuối cùng 20% và 6% glycerol. Bước 4: Đông lạnh tinh (cọng tinh được hơ 15 phút phía trên mặt ni tơ lỏng 5 cm, 15 phút trong ni tơ lỏng rồi trữ trong bình ni tơ lỏng).

Đông lạnh dạng viên: Hút 100 μ l tinh pha loãng đổ vào ni tơ lỏng tạo viên tinh trong 20 phút sau đó đưa vào đầy các ống đông lạnh 2 ml để trữ viên tinh trong ni tơ lỏng (Phillips *et al.*, 1996). (Sau giải đông, viên tinh tan thành nước trong ống 2 ml nên không cần pha với nước muối sinh lý như cách tạo tinh viên truyền thống).

- Giải đông tinh gà sau đông lạnh: Thời điểm giải đông 30 ngày sau đông lạnh. Tiến hành giải đông ở 4°C (Ehling *et al.*, 2012) trong 3 phút với cọng 0,25 ml, 5 phút với cọng 1 ml và 10 phút với ống chứa tinh viên). Sau đó, các mẫu tinh được ủ tiếp ở 37°C (trong 1 phút với cọng 0,25 ml, 3 phút với cọng 1 ml và 5 phút với ống chứa tinh đông viên) nhằm đưa nhiệt độ mẫu tinh lên gần với nhiệt độ của cơ thể khi dẫn tinh. Yêu cầu chất lượng tinh sau giải đông $A \geq 30\%$.

2.4.4. Dẫn tinh cho gà mái

Dẫn tinh cho gà mái bằng tinh sau giải đông có $A \geq 30\%$ (Phillips, 1996; Hanzawa, 2010; Ehling, 2012). Sử dụng 48 gà mái Đông Tảo (10 - 14 tháng tuổi), chia thành 4 lô (12 con/lô), trong đó lô đối chứng 12 con được giao phối trực tiếp ngẫu nhiên với 12 cá thể trống (dùng trong thí nghiệm đông lạnh tinh). Ba lô thí nghiệm, được phối bằng tinh cọng rạ 0,25 ml; 1 ml và tinh viên. Liều dẫn tinh 0,25 ml/mái với tổng số 100 - 200 triệu tinh trùng/liều (Phillips *et al.*, 1996). Tần suất phối 3 ngày/lần, lặp lại 3 lần/mái (Amann *et al.*, 1997).

Cách dẫn tinh (Đào Đức Thà, 2006): Người dẫn tinh dùng tay trái vuốt ngược lông đuôi gà lên trên, lúc này phần bên trong lỗ huyết gà mái lộ ra (hoặc có thể bóp nhẹ hai mép lỗ huyết cho phần bên trong lỗ huyết lộ ra) và người dẫn tinh chỉ cần cho dẫn tinh vào vào phần ổ nhóp nằm lệch bên trái lỗ huyết. Dùng súng bắn tinh dê cho cọng rạ 0,25 ml, súng bắn tinh gà cho cọng rạ 1 ml và xi lanh 1 ml cho tinh viên (để hút 0,25 ml từ ống dung tích 2 ml chứa tinh đông viên đã giải đông). Thời điểm dẫn tinh vào buổi chiều (4 - 6 giờ) sau khi gà đã đẻ. Mùa theo dõi: tháng 5 - 10/2015 (nóng) và tháng 11/2015 - 3/2016 (lạnh).

2.4.5. Theo dõi ấp nở

Ấp trứng bằng máy ấp: nhiệt độ ấp 37,6°C, độ ẩm 60%, tự động đảo trứng 60 phút/lần (Wilson, 1991). Theo dõi tỷ lệ% trứng có phôi sau khi phối 10 ngày.

2.5. Xử lý số liệu

Số liệu sau khi thu thập, được nhập bằng Excel, phân tích bằng phần mềm SAS 9.1. So

sánh giá trị trung bình bằng T test. Giá trị trung bình sai khác khi $P < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chất lượng tinh nguyên của gà Đông Tảo

Hiệu quả bảo tồn dù ở dạng lỏng hay đông lạnh của tinh gà nói chung đều phụ thuộc rất nhiều vào chất lượng tinh ban đầu. Chất lượng tinh của gà trống giống chịu ảnh hưởng bởi rất nhiều yếu tố gồm giống, sức khỏe, chế độ chăm sóc, mùa vụ, độ tuổi và tần suất khai thác. Các gà trống được sử dụng cho thí nghiệm, sau khi được lựa chọn đã được đưa vào cùng một chế độ chăm sóc ít nhất 1 tháng trước khi tiến hành thí nghiệm. Qua đó, việc đánh giá chất lượng tinh nguyên và các thí nghiệm sau đó được tổng hợp theo 2 mùa, tháng 5 - 10/2015 được chọn là đại diện cho mùa nóng, tháng 11/2015 - 3/2016 đại diện cho mùa lạnh. Các chỉ tiêu chất lượng tinh nguyên của 6 gà trống Đông Tảo giống sử dụng trong các thí nghiệm của nghiên cứu này được trình bày trong bảng 1.

Kết quả thí nghiệm cho thấy, các chỉ tiêu chất lượng tinh nguyên của các gà trống Đông Tảo trong thí nghiệm này vào mùa nóng tốt hơn so với mùa lạnh ($P = 0,05$). Cụ thể là lượng xuất tinh vào mùa nóng cao hơn mùa lạnh với giá trị tương ứng là $0,675 \pm 0,01$ và $0,58 \pm 0,02$ ml; hoạt lực tiến thẳng của tinh trùng cũng tương tự với giá trị trung bình tương ứng là $0,87 \pm 0,01$ và $0,84 \pm 0,01$ điểm; nồng độ tinh trùng đạt $5,025 \pm 0,03$ tỷ tinh trùng/ml vào mùa nóng, cao hơn so với vào mùa lạnh đạt $4,74 \pm 0,03$ tỷ tinh trùng/ml ($P < 0,05$); diễn biến ba chỉ tiêu nói trên kéo theo chỉ tiêu tổng hợp VAC (tổng số tinh trùng tiến thẳng/lần khai thác) vào mùa nóng cũng cao hơn so với vào mùa lạnh, đạt tương ứng $2,77 \pm 0,05$ và $2,37 \pm 0,08$ tỷ tinh trùng tiến thẳng/lần khai thác ($P < 0,05$); tỷ lệ tinh trùng sống cũng tương tự như vậy, đạt $92,20 \pm 2,20$ và $89,50 \pm 2,80\%$ ($P < 0,05$); tỷ lệ tinh trùng kỳ hình vào mùa nóng thấp hơn so với vào mùa lạnh, đạt tương ứng $21,3 \pm 0,48$ và $25,7 \pm 0,38\%$ ($P < 0,05$). Kết quả thí nghiệm 1

Bảng 1. Chất lượng tinh nguyên gà Đông Tảo theo mùa

Chỉ tiêu (đơn vị tính)	Tháng 5 - 10 / 2015 (mùa nóng, 25 - 35°C); n = 180		Tháng 11/2015 - 3/2016 (mùa lạnh, 10 - 25°C); n = 180	
	Mean ± SE	Cv%	Mean ± SE	Cv%
Lượng xuất tinh (V, ml)	0,675 ± 0,01 ^a	6,70	0,58 ± 0,02 ^b	10,31
Hoạt lực tinh trùng (A, điểm)	0,87 ± 0,01 ^a	3,60	0,84 ± 0,01 ^b	4,30
Nồng độ tinh trùng (C, tỷ/ml)	5,025 ± 0,03 ^a	5,40	4,74 ± 0,03 ^b	7,50
Tổng số tinh trùng tiến thẳng/lần khai thác (VAC, tỷ)	2,77 ± 0,05 ^a	12,70	2,37 ± 0,08 ^b	20,70
Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	92,20 ± 2,20 ^a	2,40	89,50 ± 2,80 ^b	3,10
Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	21,3 ± 0,48 ^a	7,90	25,7 ± 0,38 ^b	6,70

Ghi chú: Trên cùng một hàng, các giá trị có chữ cái bên trên khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0,05$

cũng cho thấy chất lượng tinh của các cá thể gà Đông Tảo trong thí nghiệm này khá cao so với các giống gà khác. (Mamun Tarif *et al.*, 2013). Tiến hành nghiên cứu trên giống gà Sasso cho thể tích tinh dịch đạt 0,77 - 0,80 ml; hoạt lực tinh trùng 81,7 - 85,0%; nồng độ tinh trùng đạt 9,2 - 9,9 tỷ tinh trùng/ml; tỷ lệ tinh trùng sống đạt 88,3 - 89,0%; tỷ lệ tinh trùng kỳ hình đạt 9,7 - 10,3%).

3.2. Hiệu quả bảo tồn đông lạnh tinh gà Đông Tảo vào mùa nóng

Thí nghiệm 2 được thiết kế với mục tiêu đánh giá và so sánh hiệu quả bảo tồn tinh dạng cọng rạ (1 ml và 0,25 ml) và dạng viên 6 cá thể gà Đông Tảo với ít nhất 6 lần lặp lại. Thí

nhệm làm cơ sở cho công tác bảo tồn và phát triển nguồn gen cũng như phục vụ nhân giống cung cấp cho nhu cầu xã hội đối với giống gà này. Thí nghiệm được tiến hành tương tự vào hai khoảng thời gian đại diện cho mùa lạnh và mùa nóng. Hiệu quả đông lạnh tinh cũng sẽ được tiến hành so sánh thống kê theo mùa (Bảng 2).

Chỉ tiêu hoạt lực của tinh trùng sau giải đông (%) ở 4°C đối với cọng rạ 1 ml, cọng rạ 0,25 ml, tinh viên, tương ứng là 0,54 ± 0,01; 0,49 ± 0,03; 0,36 ± 0,03 điểm sau khi ủ tiếp tục ở 37°C, hoạt lực có giảm chút ít, đạt tương ứng: 0,49 ± 0,01; 0,40 ± 0,02; 0,32 ± 0,01 điểm. Tỷ lệ sống của tinh trùng sau giải đông (%) ở 4°C đối với cọng rạ 1 ml, cọng rạ 0,25 ml, đông viên tương

Bảng 2. Kết quả đánh giá chất lượng tinh sau giải đông vào mùa nóng

Loại hình tinh sử dụng	Chỉ tiêu	Giải đông ở 4°C		Ủ tiếp tục ở 37°C	
		Mean ± SE	Cv%	Mean ± SE	Cv%
Cọng rạ 1 ml	Hoạt lực tinh trùng (điểm)	0,54 ^{aA} ± 0,01	3,0	0,49 ^{bA} ± 0,01	1,1
	Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	62,1 ^{aA} ± 5,6	8,3	52,3 ^{bA} ± 5,80	8,0
	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	16,6 ^{aA} ± 0,32	8,6	17,0 ^{bA} ± 0,22	9,7
Cọng rạ 0,25 ml	Hoạt lực tinh trùng (điểm)	0,49 ^{aB} ± 0,0	2,1	0,40 ^{bB} ± 0,02	1,5
	Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	58,1 ^{aB} ± 6,0	8,3	51,9 ^{bB} ± 5,2	8,0
	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	18,7 ^{aB} ± 0,27	24,6	19,2 ^{bB} ± 0,30	9,6
Tinh viên	Hoạt lực tinh trùng (điểm)	0,36 ^{aC} ± 0,03	1,2	0,32 ^{bC} ± 0,01	2,7
	Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	48,3 ^{aC} ± 4,9	10,0	42,5 ^{bC} ± 5,5	12,7
	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	21,1 ^{aC} ± 0,25	10,6	21,0 ^{bC} ± 0,18	9,4

Ghi chú: Trên cùng một hàng, các giá trị có chữ cái a, b bên trên và trên cùng một cột ở cùng một chỉ tiêu, các giá trị chữ cái A, B khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0,05$.

ứng là: $62,1 \pm 5,6$; $58,1 \pm 6,0$; $48,3 \pm 4,9\%$ đều cao hơn so với sau khi ủ tiếp tục ở 37°C là $52,3 \pm 5,8$; $51,9 \pm 5,2$; $42,5 \pm 5,5\%$. Tỷ lệ tinh trùng kì hình sau giải đông (%) ở 4°C đối với cọng rạ 1 ml, cọng rạ 0,25 ml, đông viên tương ứng là: $16,6 \pm 0,32$; $18,7 \pm 0,27$; $21,1 \pm 0,25\%$, không thay đổi sau khi ủ tiếp tục ở 37°C là $17,0 \pm 0,22$; $19,2 \pm 0,30$; $21,0 \pm 0,18\%$. Chất lượng tinh sau giải đông ở 4°C trong nghiên cứu này phù hợp với các kết quả công bố của Hanzawa *et al.* (2010) và Ehling *et al.* (2012) khi đông lạnh tinh gà bằng quy trình đông lạnh tinh nhanh và giải đông ở 4°C . Nghiên cứu này cũng phát hiện được rằng kết quả hoạt lực tinh trùng sau khi ủ tiếp tục ở 37°C giảm nhưng vẫn đạt yêu cầu cho dẫn tinh nhân tạo.

3.3. Hiệu quả bảo tồn đông lạnh tinh gà Đông Tảo vào mùa lạnh

Kết quả đánh giá hiệu quả bảo quản tinh đông lạnh giống gà Đông Tảo vào mùa lạnh được trình bày trong bảng 3. Sự sai khác về giá trị của chỉ tiêu hoạt lực tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng sống và tỷ lệ tinh trùng kỳ hình của các mẫu tinh sau giải đông ở nhiệt độ 4°C và tiếp tục ủ ở 37°C cho thấy cũng tương tự như kết quả thí nghiệm vào mùa nóng, tuy nhiên khi so sánh cùng một chỉ tiêu ở cùng một mức nhiệt độ giải đông và cùng một thể tích đông lạnh thì kết quả

thu nhận vào mùa lạnh đạt kém hơn so với vào mùa nóng.

Như vậy, kết quả so sánh thống kê với mức ý nghĩa 0,05 cho thấy tương ứng với mỗi dạng đông lạnh thì chỉ tiêu hoạt lực tinh trùng (A, điểm), tỷ lệ tinh trùng sống (%) và tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%) vào mùa nóng (nhiệt độ không khí từ $25 - 35^\circ\text{C}$) đều tốt hơn so với kết quả thu được vào mùa lạnh (nhiệt độ không khí từ 10 đến 25°C). Ở cả hai mùa, với nhiệt độ giải đông là 4°C (thời gian giải đông là 3 phút với cọng 0,25 ml, 5 phút với cọng 1 ml và 10 phút với ống chứa tinh đông viên) sau đó các mẫu tinh được ủ tiếp tục ở 37°C (thời gian ủ là 1 phút với cọng 0,25 ml, 3 phút với cọng 1 ml và 5 phút với ống chứa tinh đông viên - tác giả) nhằm đưa nhiệt độ mẫu tinh lên gần với nhiệt độ của cơ thể khi dẫn tinh cho thấy chất lượng tinh sau giải đông tương đối tốt tuy giảm chút ít sau khi tiếp tục ủ ở 37°C . Quy trình này được áp dụng đối với các mẫu tinh giải đông và sử dụng cho thí nghiệm kiểm tra hiệu quả phối tinh nhân tạo bằng tinh đông lạnh.

3.3. Hiệu quả dẫn tinh bằng tinh đông lạnh

Việc thực hiện thí nghiệm 3 - Đánh giá hiệu quả phối tinh nhân tạo bằng tinh đông lạnh - có ý nghĩa rất quan trọng. Kết quả này thể hiện rõ nhất hiệu quả bảo quản đông lạnh tinh giống gà

Bảng 3. Kết quả đánh giá chất lượng tinh sau giải đông vào mùa lạnh

Loại hình tinh sử dụng	Chỉ tiêu	Giải đông ở 4°C		Ủ tiếp tục ở 37°C	
		Mean $\pm$ SE	Cv%	Mean $\pm$ SE	Cv%
Cọng rạ 1 ml	Hoạt lực tinh trùng (điểm)	$0,46^{aA} \pm 0,01$	2,3	$0,38^{bA} \pm 0,01$	2,7
	Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	$53,2^{aA} \pm 3,8$	9,6	$49,3^{bA} \pm 4,1$	6,5
	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	$20,7^{aA} \pm 0,37$	6,0	$20,3^{aA} \pm 0,19$	7,1
Cọng rạ 0,25 ml	Hoạt lực tinh trùng (điểm)	$0,34^{aB} \pm 0,02$	3,5	$0,30^{bB} \pm 0,01$	1,9
	Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	$45,3^{aB} \pm 4,1$	8,4	$40,3^{bB} \pm 3,6$	9,5
	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	$23,2^{aB} \pm 0,52$	4,6	$24,1^{aB} \pm 0,4$	5,3
Tinh viên	Hoạt lực tinh trùng (điểm)	$0,29^{aC} \pm 0,01$	3,0	$0,27^{bC} \pm 0,02$	2,1
	Tỷ lệ tinh trùng sống (%)	$37,1^{aC} \pm 2,6$	7,2	$32,3^{bC} \pm 2,1$	6,8
	Tỷ lệ tinh trùng kỳ hình (%)	$30,3^{aC} \pm 0,41$	5,0	$29,2^{aC} \pm 0,27$	7,8

Ghi chú: Trên cùng một hàng, các giá trị có chữ cái a, b bên trên và trên cùng một cột ở cùng một chỉ tiêu, các giá trị chữ cái A, B khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0,05$.

Bảng 3. Kết quả phối tinh nhân tạo bằng tinh đông lạnh theo mùa

Chỉ tiêu	Mùa theo dõi	Lô đối chứng (n = 72)	Lô phối tinh cộng rạ 1 ml (n = 72)	Lô phối tinh cộng rạ 0,25 ml (n = 72)	Lô phối tinh viên (n = 72)
Hoạt lực tinh khi phối (điểm)	Mùa lạnh	-	0,38 ^a ± 0,01	0,30 ^b ± 0,01	0,27 ^c ± 0,02
	Mùa nóng	-	0,49 ^a ± 0,0	0,40 ^b ± 0,02	0,32 ^c ± 0,01
Tỷ lệ trứng có phôi (%)	Mùa lạnh	60,4 ^a ± 2,79	72,6 ^b ± 2,90	69,7 ^c ± 3,04	65,4 ^d ± 3,12
	Mùa nóng	65,9 ^a ± 2,88	75,5 ^b ± 4,23	71,6 ^c ± 3,01	67,2 ^d ± 2,34

Ghi chú: Trên cùng một hàng, các giá trị có chữ cái bên trên khác nhau thể hiện sự sai khác có ý nghĩa với $P \leq 0,05$

Đông Tảo và hiệu quả sử dụng nó cho việc thụ tinh nhân tạo giúp nâng cao hiệu quả sinh sản và tốc độ nhân đàn của giống gà này. Kết quả theo dõi thí nghiệm 3 được thể hiện trong bảng 3.

So sánh tỷ lệ trứng có phôi bằng phương pháp phối tinh nhân tạo theo 2 mùa ta thấy: Mùa nóng có tỷ lệ trứng có phôi (%) cao hơn so với mùa lạnh ở cả nguồn từ phối tự nhiên và cả 3 nguồn tinh sau giải đông là cộng rạ 1 ml, cộng rạ 0,25 ml, đông viên là $84,9 \pm 2,88$; $75,5 \pm 4,23$; $71,6 \pm 3,01$ và $67,2 \pm 2,34$, so với tỷ lệ trứng có phôi (%) khi phối ở mùa đông cho các dạng tương ứng là $80,4 \pm 2,79$; $72,6 \pm 2,90$; $69,7 \pm 3,04$; $65,4 \pm 3,12$. Tất cả trứng có phôi sau 10 ngày phối đều đạt tỷ lệ nở từ 85 đến 90%. Kết quả thí nghiệm cũng cho ta thấy bước đầu đã có thể sử dụng tinh đông lạnh để phối tinh nhân tạo ở gà Đông Tảo có hiệu quả cao hơn so với phối nhảy tự nhiên (tỷ lệ trứng có phôi chỉ đạt $60,4 \pm 2,79$ vào mùa lạnh và $65,9 \pm 2,88$ vào mùa nóng. Như vậy, các mẫu tinh đông lạnh tạo ra từ thí nghiệm 2 có chất lượng tương đối tốt và bước đầu chúng ta đã thực hiện thành công kỹ thuật thụ tinh nhân tạo cho gà Đông Tảo bằng tinh đông lạnh.

4. KẾT LUẬN

Chất lượng tinh nguyên của giống gà Đông Tảo vào mùa nóng đều tốt hơn mùa lạnh ($P < 0,05$) và tốt hơn so với một số giống gà khác.

Đông lạnh tinh gà Đông Tảo tốt nhất đối với cộng rạ 1 ml, tốt hơn so với cộng rạ 0,25 ml, còn dạng viên cho hiệu quả thấp nhất. Giải đông ở 37°C cho chất lượng tinh sau giải đông tốt hơn so với giải đông ở 70°C . Đồng thời, đông lạnh

tinh gà Đông Tảo vào mùa nóng tốt hơn so với mùa lạnh ($P < 0,05$).

Bước đầu thực hiện thành công kỹ thuật thụ tinh nhân tạo cho gà Đông Tảo bằng tinh đông lạnh giúp nâng cao hiệu quả sinh sản của giống gà quý này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abu Md. Mamun Tarif, Mohammad Musharraf Uddin Bhuiyan, Raihana Nasrin Ferdousy, Nasrin Sultana Juyena and Md. Bazlur Rahman Mollah (2013). Evaluation of semen quality among four chicken lines, IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR - JAVS), e - ISSN: 2319 - 2380, p - ISSN: 2319 - 2372, 6(5): 7-13.
- Amann RP, Gill S. P. S and Hammerstedt R. H. (1997). Maximizing Genetic Impact of Roosters: Effective Handling, Extension and Utilization of Rooster Semen and Artificial Insemination, BioPore, Inc. State College, PA, 14(6): 1-15.
- Ehling C., Taylor U., Baulain U., Weigend S., Henning M., and Rath D. (2012). Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines, Agriculture and Forestry Research, 62: 151-158.
- Giesen A. F and Sexton T. J. (1983). Beltsville poultry semen extender, 7. Comparison of commercial diluents for holding turkey semen six hours at 15°C , PMID: 6835912. Poult Sci., 62(2): 379-381.
- Hanzawa S., Niinomi T., Miyata T., Tsutsui M and Tajima A. (2010). Cryopreservation of chicken semen using glycerol and N - methylacetamide as cryoprotective agent, Jap J Poult Sci., 47: J27-J32.
- Johnson L. A., Weitze K. F., Fiser P. and Maxwell W. M. C. (2000). Storage of boar semen. Animal Reproduction Science, 62: 143-172.
- Lê Thị Thu Hiền, Phùng Đức Tiến, Nguyễn Quý Khiêm và Nguyễn Thị Tinh (2014). Bảo tồn và khai thác nguồn gen gà Đông Tảo. Tài liệu số hóa của Viện chăn nuôi. Truy cập tại: <http://vcn.vnn.vn/uploads/files/B%E1%BA%A3o%20t%E1%BB>

%93n%20ngu%E1%BB%93n%20gen/Bao%20ton
%20%20phat%20trien/B%E1%BA%A2O%20T
%E1%BB%92N%20V%C3%80%20KHAI%20TH
%C3%81C%20NGU%E1%BB%92N%20GEN%2
0G%C3%80%20%C4%90%C3%94NG%20T%E1
%BA%A2O. pdf).

- Ngo T. T. (2010). A Simplified responsiveness test for testing storage effects on liquid preserved boar spermatozoa, Master thesis, Hannover University of Veterinary Medicine, Germany.
- Phillips J. J, Bramwell R. K and Graham J. K. (1996). Cryopreservation of rooster sperm using methyl cellulose, *Poult. Sci.*, 75: 915-923.

Đào Đức Thà (2006). Kỹ thuật thụ tinh nhân tạo vật nuôi. Nhà xuất bản Lao động và Xã hội.

- Nguyễn Đăng Vang, Trần Công Xuân, Phùng Đức Tiến, Lê Thị Nga và Nguyễn Mạnh Hùng (1999). Khả năng sản xuất của gà Đông Tảo nuôi tại Thụy Phương, Chuyên san Chăn nuôi gia cầm, Hội Chăn nuôi Việt Nam, tr. 114-116.
- Wilson H. R. (1991). Physiological requirements of the developing embryo: Temperature and turning. *In*: Tullett S. G., *Avian Incubation*. Butterworth - Heinemann, London, UK, pp. 145-156.