

SPERM CRYOPRESERVATION OF IMPORTED COMMON CARP (*Cyprinus carpio*) IN LIQUID NITROGEN

Kim Thi Thoa*, Tran Thi Mai Huong, Pham Hong Nhat, Le Van Khoi, Mai Van Tai

Research Institute for Aquaculture No.1 (RIA1)

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 14/12/2022	Common carp is one of the most important cultured freshwater fish in the world and Vietnam. The objective of this study was to determine the optimal conditions of extender, dilution ratio and freezing method in sperm cryopreservation of two imported common carp (<i>Cyprinus carpio</i>) strains (Szarvas P3 and Tata) from Hungary. Sperm were diluted in different extenders (Kurokura 2 solution and grayling solution with glucose) at dilution ratios of 1:3 and 1:8 (semen: extender) and were frozen using two freezing methods: controlled-rate programmable freezer or above liquid nitrogen vapour. The results showed that using Kurokura 2 extender with dilution ratio of 1:8 (semen: extender), 10% methanol and programmable freezer (from 4°C to -4°C: 4°C min ⁻¹ ; -4°C to -80°C: 11°C min ⁻¹ , and from -80°C they were plunged directly into liquid nitrogen) after stored for 1 month has the highest post-thaw motility ($p < 0.05$) of two strains at 80.8% (Szarvas P3 strain) and 78.3% (Tata strain) compared with fresh sperm 85.8% và 85.4% respectively.
Revised: 16/5/2023	
Published: 16/5/2023	
KEYWORDS	
Cryopreservation	
Common carp	
<i>Cyprinus carpio</i>	
Extender	
Freezing method	

NGHIÊN CỨU BẢO QUẢN TINH CÁ CHÉP (*Cyprinus carpio*) NHẬP NỘI TRONG NITƠ LỎNG

Kim Thị Thoa*, Trần Thị Mai Hương, Phạm Hồng Nhật, Lê Văn Khôi, Mai Văn Tài

Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản I

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 14/12/2022	Cá chép là một trong những loài cá nuôi nước ngọt quan trọng trên thế giới và ở Việt Nam. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định dung dịch bảo quản, tỷ lệ pha loãng và phương pháp làm lạnh phù hợp nhằm xây dựng quy trình kỹ thuật bảo quản lạnh sâu tinh trùng cá chép nhập nội (đồng Szarvas P3 và Tata) từ Hungary. Nghiên cứu sử dụng các loại dung dịch bảo quản khác nhau là dung dịch Kurokura 2 và dung dịch Grayling (có glucose) ở 2 tỷ lệ pha loãng 1:3 và 1:8; 2 phương pháp làm lạnh là sử dụng máy làm lạnh có cài đặt chương trình và làm lạnh trực tiếp trên hơi nitơ lỏng. Kết quả thí nghiệm cho thấy, sử dụng dung dịch bảo quản Kurokura 2, tỷ lệ pha loãng tinh: dung dịch bảo quản là 1: 8, chất chống đông Methanol 10% và phương pháp làm lạnh chạy chương trình (Ram 1: Hạ từ 4°C xuống - 4°C, tốc độ hạ nhiệt 4°C/phút. Ram 2: Hạ từ - 4°C xuống - 80°C, tốc độ hạ nhiệt 11°C/phút, sau đó mẫu tinh nhanh chóng được chuyển vào lưu giữ trong bình nitơ lỏng) cho hoạt lực tinh sau bảo quản cao nhất lần lượt đạt 80,8% và 78,3% ở cá chép Szarvas P3 và Tata so với đối chứng sử dụng tinh tươi 85,8% và 85,4% 1 tháng sau bảo quản ($p < 0,05$).
Ngày hoàn thiện: 16/5/2023	
Ngày đăng: 16/5/2023	
TỪ KHÓA	
Bảo quản tinh	
Cá chép	
<i>Cyprinus carpio</i>	
Dung dịch bảo quản	
Phương pháp làm lạnh	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.7095>

* Corresponding author. Email: kimthoa7575@ria1.org

1. Mở đầu

Bảo quản tinh động vật thủy sản có vai trò quan trọng trong việc bảo tồn quỹ gen, lưu giữ dòng thuần và những phẩm giống có chất lượng tốt phục vụ cho các chương trình chọn giống [1]. Nghiên cứu bảo quản tinh cá được công bố đầu tiên vào năm 1953, cho đến hiện nay có khoảng hơn 200 loài cá khác nhau được nghiên cứu bảo quản tinh [2]. Trên cá chép, nghiên cứu bảo quản tinh đầu tiên được thực hiện vào năm 1977 bởi nhóm nghiên cứu của tác giả Moczarowski [3]. Tuy nhiên, bảo quản tinh cá chép thành công cho kết quả cao với tỷ lệ thụ tinh đạt 69% so với đối chứng đạt 83%, khi sử dụng dung dịch bảo quản Kurokura 2 và chất chống đông DMSO 15% [3]. Cho đến nay, bảo quản tinh cá chép đã khá thành công và đã áp dụng hiệu quả vào thực tiễn [4]. Cá chép ở Hungary nuôi và phát triển mạnh chiếm tới 76% trong số các loài cá nuôi (cá chép, cá hồi, cá tầm, cá trê, cá nheo,...) [2]. Công tác bảo tồn nguồn gen cá chép, công nghệ bảo quản lạnh tinh cá chép được thực hiện từ rất sớm, với nhiều công trình nghiên cứu được công bố và cho đến nay đã hoàn thiện quy trình bảo quản tinh cá chép. Ngân hàng gen tinh đông lạnh cá chép được thành lập từ năm 2005 ở Szarvas, Hungary và được quản lý bởi Trung tâm nghiên cứu và đổi mới nông nghiệp quốc gia, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản (NAIK HAKI) [4].

Ở Việt Nam, nghiên cứu bảo quản tinh cá chép được thực hiện từ năm 2000 và thông qua 02 đề tài thuộc Chương trình Công nghệ sinh học Nông nghiệp, Thủy sản giai đoạn 2006-2015. Đến nay, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1 đã xây dựng quy trình bảo quản tinh cá chép với Hoạt lực tinh sau 01 tuần bảo quản đạt 60% [5]-[7], thấp hơn so với quy trình bảo quản tinh cá chép của Hungary hoạt lực tinh đạt 63% [8]. Dòng cá Chép vây Szarvas P3 và Tata là hai dòng cá chép nuôi phổ biến ở Hungary được nhập về Việt Nam vào tháng 07 năm 2019 thông qua dự án: “Nghiên cứu nâng cao chất lượng nguồn gen trong lĩnh vực thủy sản và vật nuôi thông qua hợp tác giữa Việt Nam và Hungary”, thuộc Nghị định thư Việt Nam - Hungary. Dựa trên kết quả nghiên cứu thành công quy trình bảo quản tinh cá chép của Hungary, chúng tôi nghiên cứu ứng dụng và cải tiến áp dụng công nghệ này cho 02 dòng cá chép Szarvas P3 và Tata nhập nội nuôi tại Việt Nam. Mục tiêu nhằm xây dựng quy trình bảo quản tinh đông lạnh 02 dòng cá này, hoạt lực tinh sau bảo quản đạt trên 70% để phục vụ sản xuất và chọn giống cá chép trong thời gian tới.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu sử dụng trong nghiên cứu là 02 dòng Cá chép (*Cyprinus carpio*) bố mẹ nhập nội, cá chép Szarvas P3 và cá chép Tata thuộc Trung tâm Quốc gia giống thủy sản nước ngọt miền Bắc (Viện nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1), Chí Linh - Hải Dương. Cá bố mẹ được thu tinh có độ tuổi 1,5-2,5 tuổi, trọng lượng 1,0-2,5 kg/cá thể trong mùa vụ sinh sản (tháng 02 - tháng 04 hàng năm). Tổng số cá đực được thu là 15 con/dòng cá. Nghiên cứu được tiến hành trong thời gian từ tháng 02 năm 2021 đến tháng 06 năm 2022.

2.1. Thu mẫu tinh và đánh giá chất lượng tinh cá chép

Cá đực thành thục, khỏe mạnh được chọn và tiêm kích dục tố vào thời gian và liều lượng như sau: Cá chép tiêm 0,0125 mg LRHa-3 + 3,75 mg DOM /kg lúc 12h đêm và thu tinh vào sáng sớm 5-6h. Kỹ thuật lấy tinh: bóc cá bằng vải mềm, dùng vải mềm thấm khô lỗ sinh dục cá để tránh nước lã trong tinh. Vuốt nhẹ theo lườn bụng cá xuôi từ phía đầu xuống đuôi. Tinh cá chép thu vào các hộp mẫu, nhanh chóng đậy nắp và đặt mẫu trong thùng đá ở nhiệt độ 4°C. Chú ý khi thu tinh tránh lẫn phân và máu trong mẫu tinh.

Xác định hoạt lực tinh: Nhỏ 10 μ l tinh trùng trên lam kính, cho thêm một giọt nước cất để kích hoạt tinh trùng. Nhanh chóng đậy một lamên lên giọt tinh dịch sao cho giọt tinh dịch được giàn đều ra 4 cạnh. Quan sát hoạt động của tinh trùng trên kính hiển vi có độ phóng đại 400 lần. Chất lượng tinh trùng được đánh giá bằng tỷ lệ % tinh trùng có hoạt động tiến thẳng trên tổng số tinh trùng có trong vi trường quan sát.

Xác định mật độ tinh trùng: Mật độ tinh trùng được kiểm tra bằng buồng đếm hồng cầu haematocytometer dưới kính hiển vi có độ phóng đại 400 lần. Tinh dịch được pha loãng trong ống pha loãng hồng cầu với bội số pha loãng nhỏ nhất là 1:1000, lắc đều và nhỏ một giọt vào buồng đếm hồng cầu đã chuẩn bị sẵn. Đếm tinh trùng trong các ô đếm (4 ô ở 4 góc và một ô ở giữa, mỗi ô trung bình có 16 ô nhỏ, mỗi ô nhỏ có diện tích $1/400 \text{ mm}^2$ và độ sâu $1/10 \text{ mm}$).

Đo độ pH: Độ pH của tinh dịch được đo bằng máy pH metter (Mettler 220). Nhúng đầu cực của máy đo vào tinh dịch, đọc kết quả khi có tín hiệu kết thúc quá trình.

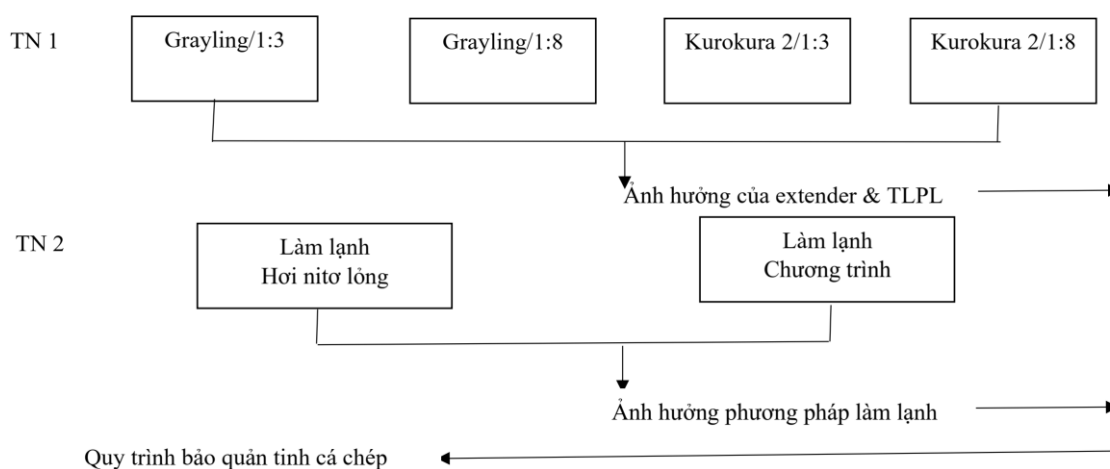
2.2. Pha loãng tinh với dung dịch bảo quản, chất chống đông và nồng độ

Để xác định dung dịch bảo quản tốt nhất cho bảo quản tinh trùng cá chép, ta tiến hành bảo quản tinh trùng trong 02 dung dịch bảo quản Kurokura-2 và Grayling. Thành phần của các chất bảo quản sử dụng để bảo quản đông lạnh tinh trùng cá chép được thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần dung dịch bảo quản (Extender) sử dụng trong nghiên cứu

Extender								DVT: gam/lít
	NaCl	KCl	NaHCO ₃	CaCl ₂	MgCl ₂	Glucose	Tris	pH
Kurokura-2	3,6	10	0,2	0,22	0,08	-	-	8,09
Grayling	-	2,98	-	-	-	36,03	3,63	8,00

Nghiên cứu ảnh hưởng của dung dịch bảo quản và tỷ lệ pha loãng tinh được thể hiện qua hình 1. Thí nghiệm sử dụng 2 dung dịch bảo quản khác nhau là Kurokura 2 và Grayling. Chất chống đông sử dụng là Methanol nồng độ 10%. Tỷ lệ pha loãng (TLPL) của tinh: Extender là 1:3 và 1:8. Hoạt lực tinh được kiểm tra sau 1 tháng bảo quản. Thí nghiệm lặp lại 3 lần cho mỗi công thức thí nghiệm và lặp lại 2 lần theo thời gian các đợt khác nhau (năm 2021 và năm 2022). Đối chứng là tinh tươi trước khi đưa vào bảo quản.



Hình 1. Sơ đồ nghiên cứu ảnh hưởng của Extender, tỷ lệ pha loãng tinh và phương pháp làm lạnh khác nhau đến hoạt lực tinh bảo quản của cá chép nhập nội

2.3. Cân bằng nhiệt, đóng cọng và làm lạnh

Sau khi tinh được pha loãng với extender và chất chống đông, lắc đều để cân bằng ở nhiệt độ $4 - 6^\circ\text{C}$ trong 5 phút. Sau đó tinh được hút vào cọng mẫu có thể tích $0,25 - 0,5 \text{ ml}$ bằng pipet và được hàn kín bằng panh đã hơi nóng trên đèn cồn, thấm khô và làm lạnh theo phương pháp làm lạnh khác nhau.

Thí nghiệm ảnh hưởng của phương pháp làm lạnh khác nhau đến tinh đông lạnh cá chép nhập nội trình bày ở hình 1. Thí nghiệm sử dụng 2 phương pháp làm lạnh khác nhau: (1) Phương pháp làm lạnh theo chương trình bằng máy Cryogenic CL 8800i (Úc) (PP1) và (2) làm lạnh trực tiếp trên hơi ni tơ lỏng (PP2). PP1 làm lạnh theo chương trình, Ram 1: Hạ từ 4°C xuống -4°C , tốc độ

hạ nhiệt 4°C/phút. Ram 2: Hạ từ - 4°C xuống - 80°C, tốc độ hạ nhiệt 11°C/phút. Sau khi làm lạnh đạt đến - 80°C, mẫu tinh nhanh chóng được chuyển vào các canister giữ trong bình nitơ lỏng (-196°C). Theo PP2, các mẫu tinh cộng rạ làm lạnh cách bề mặt nitơ lỏng 3 cm trong thời gian 3 phút, sau đó các mẫu tinh cộng rạ chuyển thẳng vào bình nitơ lỏng lưu giữ mẫu. Hoạt lực tinh được kiểm tra sau 1 tháng bảo quản.

Thí nghiệm lặp lại 3 lần cho mỗi công thức thí nghiệm. Đối chứng là tinh tươi trước khi đưa vào bảo quản.

2.4. Giải đông, kiểm tra hoạt lực tinh sau bảo quản

Sau thời gian 1 tháng, tinh bảo quản được giải đông trong nước ấm ở nhiệt độ 40°C trong 8-10 giây, sau đó thấm khô cộng mẫu, cắt 2 đầu cộng, kiểm tra hoạt lực tinh.

2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được thu thập và phân tích trên phần mềm SPSS 22.0, so sánh Turkey với mức ý nghĩa $\alpha = 0,05$. Số liệu là tỷ lệ phần trăm được chuyển đổi (arcos) về dạng phân phối chuẩn trước khi đưa vào phân tích.

3. Kết quả nghiên cứu và thảo luận

3.1. Một số đặc điểm sinh học 02 dòng cá chép nhập nội Szarvas P3 và Tata

Các mẫu tinh nghiên cứu được thu từ cá đực trong mùa sinh sản, số lượng 15 cá thể/dòng, trọng lượng dao động từ 1,2 đến 2,3 kg/cá thể và trung bình $1,65 \pm 0,38$ kg/cá thể với dòng Szarvas P3 và dao động từ 1,01 đến 2,00 kg, trung bình $1,57 \pm 0,26$ kg/cá thể với dòng Tata. Một số đặc điểm sinh học tinh dịch cá chép được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Một số đặc điểm sinh học 02 dòng cá chép nhập nội Szarvas P3 và Tata

Dòng cá chép	Szarvas P3			Tata		
	Min	Max	TB $\pm$ SE	Min	Max	TB $\pm$ SE
Chiều dài (cm/con)	38,00	46,00	$41,80 \pm 2,52$	35,50	46,00	$42,09 \pm 3,14$
Trọng lượng (g/con)	1,20	2,30	$1,65 \pm 0,38$	1,01	2,00	$1,57 \pm 0,26$
Lượng tinh/cá thể (ml)	3,80	8,20	$5,68 \pm 1,42$	4,00	7,80	$5,70 \pm 1,15$
Độ pH tinh dịch	6,83	8,00		6,71	8,10	
Mật độ tinh trùng ($\times 10^9$ TB/ml)	18,05	32,85	$24,25 \pm 4,80$	17,25	20,75	$19,39 \pm 1,03$
Hoạt lực tinh trùng (%)	60,00	90,00	$81,33 \pm 9,72$	60,00	90,00	$82,00 \pm 8,41$
Thời gian hoạt động của tinh trùng (s)	60,00	130,00	$95,00 \pm 20,18$	55,00	90,00	$70,00 \pm 11,01$

Kết quả Bảng 2 cho thấy, mật độ tinh trùng trung bình của cá chép Tata và chép Szarvas P3 lần lượt đạt $19,39 \times 10^9$ tb/ml và $24,25 \times 10^9$ TB/ml. Độ pH của tinh dịch hơi kiềm, dao động từ 6,71 đến 8,10 ở dòng Tata và từ 6,83 đến 8,00 ở dòng Szarvas P3. Hoạt lực tinh cao >80%. Lượng tinh trùng trung bình trên từng cá thể cá chép của cả 2 dòng khoảng >5,6 ml. Thời gian hoạt động của tinh trùng 2 dòng cá chép Szarvas P3 và Tata lần lượt là $95,00 \pm 20,18$ s và $70,00 \pm 11,01$ s.

Kết quả nghiên cứu cho thấy mật độ tinh trùng cá chép Tata tương đương với các dòng cá chép đang nuôi ở Việt Nam (chép Hungary, chép vàng Indonesia và chép chọn giống V1), nhưng thấp hơn mật độ tinh cá chép Szarvas P3 [5]. Độ pH tinh dịch cá chép 2 dòng nhập nội này tương đồng với độ pH của 2 dung dịch bảo quản trong nghiên cứu đã lựa chọn. Hoạt lực tinh cao, đảm bảo chất lượng để nghiên cứu bảo quản tinh. Lượng tinh trùng trung bình trên từng cá thể của 2 dòng cá này cao hơn so với lượng tinh thu được từ các dòng cá chép nuôi ở Việt Nam (khoảng 2 ml/cá thể) [5]. Thời gian hoạt động của tinh trùng 2 dòng cá chép này ngắn khi kích hoạt tinh trùng bằng nước cất nên trong quá trình giải đông, thụ tinh với tinh bảo quản cần thao tác nhanh. Thời gian hoạt động của tinh trùng cá chép Tata và Szarvas P3 tương ứng với một số loài cá nước ngọt

khác như cá hồi nâu *Salmo trutta macrostigma* ($57,4 \pm 3,8$ s), cá chép Koi *Cyprinus carpio* ($125,2 \pm 3,5$ s) [9] cá *Labeo calbasu* Ấn độ (dao động 60-138 s) [10].

3.2. Xác định dung dịch bảo quản và tỷ lệ pha loãng phù hợp

Hoạt lực (%) của tinh trùng cá chép bảo quản trong hai dung dịch bảo quản và hai tỷ lệ pha loãng khác nhau được trình bày ở Bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của dung dịch bảo quản và tỷ lệ pha loãng đến chất lượng tinh cá chép sau bảo quản

Dòng cá	Dung dịch bảo quản/ Tỷ lệ pha loãng	Hoạt lực tinh sau bảo quản (%) (N = 10 mẫu) năm 2021	Hoạt lực tinh sau bảo quản (%) (N = 10 mẫu) năm 2022
Szarvas P3	Grayling/ 1:3 (E1R1)	$32,5 \pm 8,58^c$	$28,5 \pm 8,83^c$
	Grayling/ 1:8 (E1R2)	$39,5 \pm 6,43^c$	$35,00 \pm 5,77^c$
	Kurokura-2/ 1:3 (E2R1)	$72,5 \pm 7,91^b$	$70,50 \pm 5,50^b$
	Kurokura-2/ 1:8 (E2R2)	$80,00 \pm 6,24^a$	$81,50 \pm 3,3^a$
	Đối chứng	$81,67 \pm 9,34^a$	$82,59 \pm 8,62^a$
Tata	Grayling/ 1:3 (E1R1)	$30,0 \pm 5,77^d$	$34,0 \pm 4,59^c$
	Grayling/ 1:8 (E1R2)	$41,5 \pm 6,69^c$	$40,0 \pm 7,45^c$
	Kurokura-2/ 1:3 (E2R1)	$62,5 \pm 7,91^b$	$71,0 \pm 4,59^b$
	Kurokura-2/ 1:8 (E2R2)	$63,5 \pm 9,44^b$	$75,0 \pm 7,82^b$
	Đối chứng	$81,92 \pm 8,31^a$	$83,74 \pm 7,49^a$

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn trung bình $\pm$ sai số chuẩn ($TB \pm SE$) trong cùng một cột, các giá trị trung bình có ký tự mũ (*a, b, c, ...*) khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Đối với cá chép Szarvas P3, hoạt lực tinh bảo quản sau 1 tháng khi sử dụng dung dịch bảo quản Kurokura-2 ở tỷ lệ pha loãng 1:8 năm 2021 và 2022 lần lượt là $80,00 \pm 6,24\%$ và $81,50 \pm 3,3\%$ tương đương với hoạt lực tinh của tinh tươi ($81,67 \pm 9,34\%$ và $82,59 \pm 8,62\%$) và cao hơn các nghiệm thức còn lại ($P < 0,05$). Tiếp theo là E2R1 và cuối cùng là E1R1 và E1R2, khi so sánh hoạt lực tinh sau bảo quản ($P < 0,05$). Đối với cá chép Tata, hoạt lực tinh bảo quản sau 1 tháng khi sử dụng dung dịch bảo quản Kurokura-2 ở tỷ lệ pha loãng 1:3 và 1:8 lần lượt là $62,5 \pm 7,91$; $63,5 \pm 9,44\%$ (năm 2021) và $71,0 \pm 4,59$; $75,0 \pm 7,82$ (năm 2022). Hoạt lực tinh sau bảo quản của hai nghiệm thức này nhỏ hơn tinh tươi ($81,92 \pm 8,31\%$ năm 2021 và $83,74 \pm 7,49$ năm 2022) và cao hơn các nghiệm thức còn lại ($P < 0,05$); tuy nhiên, giữa hai nghiệm thức sai khác không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Việc lựa chọn dung dịch bảo quản thích hợp rất quan trọng và thành phần dung dịch bảo quản là một trong những yếu tố quyết định đến kết quả bảo quản tinh trùng. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, dung dịch bảo quản Kurokura-2 với hai tỷ lệ pha loãng 1:3 và 1:8 phù hợp cho bảo quản tinh cá chép Tata và tỷ lệ 1:8 phù hợp với cá chép Szarvas P3. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đây sử dụng dung dịch Kurokura-2 bảo quản tinh cá chép [3], [11]-[13], cá rô hu [14] và các dung dịch ion khác [15], [16]. Mặc dù dung dịch bảo quản Grayling với tỷ lệ pha loãng 1:8 được chứng minh hiệu quả với bảo quản tinh cá chép ở Hungary, với hoạt lực tinh sau giải đông đạt 52,0% [17], nhưng áp dụng với 2 dòng cá chép nhập nội nuôi tại Việt Nam thì kết quả của chúng tôi thấp hơn, không mang lại hiệu quả so với dung dịch bảo quản Kurokura-2. Dung dịch Grayling có hàm lượng đường glucose cao (chiếm 84,5%, như bảng 1). Glucose vừa đóng vai trò là chất chống đông cao phân tử không xâm nhập màng, vừa là dung dịch bảo quản cung cấp năng lượng cho các chức năng chính của tinh trùng thông qua quá trình đường phân ở tế bào chất của tế bào tinh trùng và cung cấp năng lượng cho quá trình trao đổi chất của tinh trùng [18]. Đường fructose và glucose được coi là nguồn năng lượng chính trong tế bào tinh trùng [19]. Để giữ thăng bằng về áp lực thẩm thấu và ổn định pH cho tinh trùng, trong dung dịch bảo quản phải có các chất điện giải. Tuy nhiên, các ion dương của chất điện giải thường gây hại đến màng tinh trùng; vì vậy phải có các chất không điện giải ngăn ngừa tác động có hại của các ion, tránh hiện tượng làm mất điện tích trên bề mặt tinh trùng, gây tụ dính ở tinh trùng [20]. Trong nghiên

cứ này, khi sử dụng dung dịch bảo quản với hàm lượng đường glucose, là chất điện giải cao, gây tụ dính tinh trùng và bám dính trên lam sau giải đông [17]. Theo chúng tôi, đó có thể là nguyên nhân gây ảnh hưởng đến hoạt lực tinh trùng cá chép khi sử dụng dung dịch Grayling.

3.3. Xác định phương pháp làm lạnh phù hợp

Dựa trên kết quả thí nghiệm ảnh hưởng của dung dịch bảo quản và tỷ lệ pha loãng đến chất lượng tinh sau bảo quản ở trên, chúng tôi tiến hành thí nghiệm ảnh hưởng của 2 phương pháp làm lạnh đến chất lượng tinh sau bảo quản. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Ảnh hưởng của phương pháp làm lạnh đến chất lượng tinh cá chép sau bảo quản

Phương pháp làm lạnh	N (số mẫu)	Hoạt lực tinh sau bảo quản (%) (dòng Szavas P3)	Hoạt lực tinh sau bảo quản (%) (dòng Tata)
Hơi nitơ lỏng	18	77,2 ± 6,24 ^b	79,4 ± 4,82 ^b
Chương trình	18	80,8 ± 3,09 ^b	78,3 ± 5,14 ^b
Đối chứng	18	85,8 ± 5,15 ^a	85,4 ± 5,42 ^a

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn trung bình ± sai số chuẩn (TB ± SE) trong cùng một cột, các giá trị trung bình có ký tự mũ (a, b, c...) khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Sau bảo quản, hoạt lực tinh khi sử dụng phương pháp làm lạnh hơi nitơ và chạy chương trình đạt khá cao lần lượt là 77,2 và 80,8% với dòng Szavas P3 và 79,4% và 78,3% với dòng Tata, và sự sai khác không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Trong khi đó, hoạt lực tinh tươi ở dòng cá chép Szavas P3 và Tata lần lượt đạt 85,8% và 85,4%, cao hơn hoạt lực của tinh bảo quản ($P < 0,05$). Như vậy, có thể thấy cả hai phương pháp làm lạnh đều có thể sử dụng bảo quản tinh cá chép, kết quả này cũng được chứng minh qua nhiều nghiên cứu công bố cả hai phương pháp làm lạnh đều có hiệu quả với bảo quản tinh cá chép. Nghiên cứu của Hováth và đồng tác giả (2003) [8] cho thấy, tinh được bảo quản với dung dịch grayling, 10% Methanol, hoạt lực tinh, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ nở đạt cao nhất khi sử dụng phương pháp làm lạnh trên hơi nitơ lỏng cách bề mặt 3 cm trong thời gian 3 phút. H. Irawan (2010) nghiên cứu bảo quản tinh cá chép sử dụng nhiều phương pháp làm lạnh khác nhau cho thấy, làm lạnh trên hơi ni tơ lỏng cách bề mặt 2 cm trong thời gian 10 phút cho hiệu quả nhất, hoạt lực tinh sau bảo quản đạt 91,7% và kể đến là phương pháp làm lạnh có chương trình (hạ nhiệt từ 25°C xuống - 40°C, sau đó chuyển mẫu nhúng lưu giữ dài hạn trong ni tơ lỏng) hoạt lực tinh đạt 89,4% [21]. Ngoài ra, còn nhiều công trình khác công bố bảo quản tinh cá chép sử dụng phương pháp làm lạnh trên hơi ni tơ lỏng có hiệu quả cao [11], [12], [16] cũng như làm lạnh có chương trình có hiệu quả [5], [6], [3]. Tuy vậy, theo chúng tôi nếu trong điều kiện phòng thí nghiệm có máy làm lạnh chạy chương trình thì sử dụng phương pháp này để tinh ổn định cao hơn, vì khi sử dụng làm lạnh trực tiếp trên hơi ni tơ lỏng thì thoáng gây ra hiện tượng cộng rạ bị gãy sau quá trình giải đông.

4. Kết luận

Ứng dụng và cải tiến quy trình công nghệ bảo quản tinh 02 dòng cá chép nhập nội Szarvas P3 và Tata bằng sử dụng các dung dịch bảo quản và phương pháp làm lạnh khác nhau cho thấy dung dịch bảo quản Kurokura 2, tỷ lệ pha loãng 1: 8 (tinh: extender), chất chống đông Methanol 10% và phương pháp làm lạnh chạy chương trình cho kết quả tốt nhất. Hoạt lực tinh sau bảo quản 1 tháng lần lượt đạt 80,8% và 78,3% so với đối chứng sử dụng tinh tươi 85,8% và 85,4%. Áp dụng quy trình này hoạt lực tinh cá chép sau bảo quản được nâng cao so với quy trình bảo quản tinh trước đây chỉ đạt 50-60%.

Lời cảm ơn

Nhóm nghiên cứu chân thành cảm ơn nhiệm vụ Nghị định thư “Nghiên cứu nâng cao chất lượng nguồn gen trong lĩnh vực thủy sản và vật nuôi thông qua hợp tác giữa Việt Nam và Hungary” đã hỗ trợ kinh phí và Trung tâm quốc gia giống thủy sản nước ngọt miền Bắc, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng

thủy sản I đã cung cấp mẫu vật và hỗ trợ việc thu mẫu tinh cá chép trong việc triển khai thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] N. K. Agarwal, "Cryopreservation of Fish Semen," *Himal. Aquat. Biodivers. Conserv. New Tools Biotechnol.*, 2011, pp. 104-127.
- [2] T. R. Tiersch, H. Yang, J. A. Jenkins, and Q. Dong, "Sperm cryopreservation in fish and shellfish," *Spermatology*, vol. 65, pp. 493-508, 2007.
- [3] I. Magyary, B. Urbányi, and L. Horváth, "Cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm II. Optimal conditions for fertilization," *Journal of Applied Ichthyology*, vol. 12, no. 2, pp. 117-119, 1996.
- [4] S. Martínez-Páramo *et al.*, "Cryobanking of aquatic species HHS Public Access," *Aquaculture*, vol. 472, pp. 156-177, 2017.
- [5] T. T. Kim, T. M. Tran, Q. H. Le, H. N. Pham, V. D. Nguyen, D. N. Ngo and V. M. Nguyen, "Applied Nito-method technology for cryobanking of aquatic species in Vietnam (in Vietnamese). Final report, *Research Institute for Aquaculture No.1*, 2010.
- [6] T. T. Kim, H. N. Pham, H. D. Nguyen, T. B. N. Tran, N. S. Hoang, V. D. Nguyen, V. T. Khuong, Q. T. Trinh, A. T. Le, "Cryopressevation of some important aquatic species in Vietnam (in Vietnamese), Final report, *Research Institute for Aquaculture No.1*, 2014.
- [7] H. N. Pham, T. T. Kim, V. D. Nguyen, T. T. T. Nguyen and H. D. Nguyen, "Sperm cryopressevation of aquatic animals in Vietnam (in Vietnamese), *Science technology in Aquaculture*, 2016, pp. 1-10.
- [8] Á. Horváth, E. Miskolczi, and B. Urbányi, "Cryopreservation of common carp sperm," *Aquatic Living Resources*, vol. 16, no. 5, pp. 457-460, 2003.
- [9] Y. Bozkurt, İ. Yavas, and F. Karaca, "Cryopreservation of Brown Trout (*Salmo trutta macrostigma*) and Ornamental Koi Carp (*Cyprinus carpio*) Sperm," in *Current Frontiers in Cryopreservation*, 2012, pp. 293-304.
- [10] M. M. Hassan, M. Nahiduzzaman, S. N. Al Mamun, M. A. Taher, and M. A. R. Hossain, "Fertilization by refrigerator stored sperm of the Indian major carp, *Labeo calbasu* (Hamilton, 1822)," *Aquac. Res.*, vol. 45, pp. 150-158, 2014.
- [11] E. Akçay, Y. Bozkurt, S. Seçer, and N. Tekin, "Cryopreservation of Mirror Carp Semen," *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, vol. 28, pp. 837-843, 2004.
- [12] H. Kurokura, R. Hirano, M. Tomita, and M. Iwahashf, "Cryopreservation of Carp Sperm," *Aquaculture*, vol. 37, pp. 267-273, 1984.
- [13] E. Lubzens *et al.*, "Carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa cryobanks - Strategies in research and application," *Aquaculture*, vol. 155, no. 1-4, pp. 13-30, 1997.
- [14] S. Bibi *et al.*, "Identification of suitable extender and cryoprotectant for cryopreservation of *Labeo rohita* milt," *Aquac. Res.*, vol. 53, no. 17, pp. 5857-5864, 2022.
- [15] M. Sultana, M. Nahiduzzaman, M. M. Hassan, M. U. H. Khanam, and M. A. R. Hossain, "Fertility of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa," *Rajshahi Univ. Zool. Soc.*, vol. 28, pp. 51-55, 2010.
- [16] F. Lahnsteiner, B. Berger, A. Horvath, B. Urbanyi, and T. Weismann, "Cryopreservation of Spermatozoa Ln Cyprinid Fishes," *Theriogenology*, vol. 54, pp. 1477-1498, 2000.
- [17] G. Bernáth *et al.*, "Improvement of Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Sperm Cryopreservation Using a Programable Freezer," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 237, pp. 78-88, 2016.
- [18] S. S. du Plessis, A. Agarwal, G. Mohanty, and M. van der Linde, "Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use?," *Asian J. Androl.*, vol. 17, pp. 230-235, 2015.
- [19] R. I. Arifiantini, T. L. Y. B. Purwantara, and D. Sajuthi, "Effect of Different Cryoprotective Agents on Skim Milk and Dimitropoulus Extender for Stallion Semen Cryopreservation," *J. Indones. Trop. Anim. Agric.*, vol. 35, pp. 68-74, 2010.
- [20] V. T. Do, "Research on sperm characters and cypropreservation of goat in Vietnam (in Vietnamese)," PhD. Thesis, *Institute of Biotechnology, Hanoi*, 153 p., 2000.
- [21] H. Irawan, V. Vuthiphandchai, and S. Nimrat, "The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm," *Animal Reproduction Science*, vol. 122, no. 3-4, pp. 236-243, 2010.