

ẢNH HƯỞNG CỦA THỜI GIAN BẢO QUẢN VÀ TỶ LỆ PHA LOÃNG ĐẾN CHẤT LƯỢNG TINH TRÙNG GÀ TRE BẢO QUẢN Ở 5 °C

Trần Thị Thanh Khuong^{1*}, Nguyễn Lâm Khánh Duy¹, Trần Chí Công¹, Nguyễn Huỳnh Châu Minh¹,
Phạm Trường Thoại Kha²

¹ Phòng thí nghiệm Tế bào gốc, Viện Thực phẩm và Công nghệ sinh học, Đại học Cần Thơ, Cần Thơ, Việt Nam
² Công ty Cổ Phần GREENFEED Việt Nam, Nhứt Chánh, Bến Lức, Long An, Việt Nam

* Tác giả liên hệ Trần Thị Thanh Khuong <tttkhuong@ctu.edu.vn>

(Ngày nhận bài: 18-09-2025; Hoàn thành phản biện: 25-02-2026; Ngày chấp nhận đăng: 02-03-2026)

Tóm tắt. Bảo quản tinh trùng phục vụ quá trình thụ tinh nhân tạo là một kỹ thuật quan trọng trong duy trì và phát triển nhanh số lượng vật nuôi. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định tỷ lệ pha loãng và thời gian bảo quản tối ưu của tinh trùng gà Tre (*Gallus gallus domesticus*) ở 5 °C. Tinh dịch được thu nhận, đánh giá chất lượng ban đầu, sau đó pha loãng với môi trường SCE ở bốn tỷ lệ khác nhau (1:4, 1:6, 1:8 và 1:10) và bảo quản trong 12 giờ. Chất lượng tinh trùng được theo dõi tại 5 thời điểm (0, 3, 6, 9 và 12 giờ) thông qua các chỉ tiêu: di động tổng số, di động tiến tới, tỷ lệ sống, tính toàn vẹn màng và tính toàn vẹn acrosome. Kết quả cho thấy tỷ lệ pha loãng 1:6 duy trì chất lượng tinh trùng tương đương 1:4 ($p > 0,05$) và cao hơn đáng kể so với 1:8 và 1:10 ($p < 0,05$) ở hầu hết các chỉ tiêu. Sau 9 giờ bảo quản ở tỷ lệ 1:6, các giá trị lần lượt đạt: di động tổng số 56,92%, di động tiến tới 38,74%, tỷ lệ sống 69,38%, toàn vẹn màng 59,97% và tính toàn vẹn acrosome 75,36%. Kết quả cho thấy bảo quản tinh trùng gà Tre ở 5 °C với tỷ lệ pha loãng 1:6 trong tối đa 9 giờ là điều kiện bảo quản hiệu quả trong nghiên cứu này, có ý nghĩa thực tiễn trong bảo tồn và nhân giống giống gà bản địa Việt Nam.

Từ khóa: 5°C, bảo quản, gà Tre, thời gian, tinh trùng, tỷ lệ pha loãng

Effects of storage duration and dilution ratio on the quality of Tre rooster sperm stored at 5 °C

Tran Thi Thanh Khuong^{1*}, Nguyen Lam Khanh Duy¹, Tran Chi Cong¹, Nguyen Huynh Chau Minh¹,
Pham Truong Thoai Kha²

¹ Stem Cell Laboratory, Institute of Food and Biotechnology, Can Tho University, Cantho, Vietnam

² GREENFEED Vietnam Joint Stock Company, Nhut Chanh, Ben Luc, Long An, Vietnam

* Correspondence to Tran Thi Thanh Khuong <tttkhuong@ctu.edu.vn>

(Received: 18 September 2025; Revised: 25 February 2026; Accepted: 02 March 2026)

Abstract. Semen storage for artificial insemination is an important technique for maintaining and rapidly increasing livestock populations. This study was conducted to determine the optimal dilution ratio and storage duration for Tre chicken (*Gallus gallus domesticus*) semen stored at 5 °C. Semen samples were collected, initially evaluated for quality, then diluted with SCE extender at four different ratios (1:4, 1:6, 1:8, and 1:10) and stored for 12 hours. Sperm quality was assessed at five time points (0,

3, 6, 9, and 12 hours) based on total motility, progressive motility, viability, membrane integrity, and acrosome integrity. The results showed that the 1:6 dilution ratio maintained sperm quality comparable to the 1:4 ratio ($p > 0.05$) and significantly higher than the 1:8 and 1:10 ratios ($p < 0.05$) for most evaluated parameters. After 9 hours of storage at the 1:6 dilution ratio, total motility, progressive motility, viability, membrane integrity, and acrosome integrity reached 56.92%, 38.74%, 69.38%, 59.97%, and 75.36%, respectively. These findings indicate that storing Tre chicken semen at 5 °C with a dilution ratio of 1:6 for up to 9 hours is an effective condition in this study, with practical significance for the conservation and breeding of indigenous chicken breeds in Vietnam.

Keywords: 5°C, dilution ratio, storage duration, sperm, Tre chicken

1 Mở đầu

Gà Tre thuộc giống gà nhà là một trong những giống gà đẹp ở Việt Nam, phân bố từ Bắc vào Nam tập trung nhiều ở vùng Đông Nam Bộ, Nam Bộ, thường được dùng làm cảnh và thi chọi gà ở nhiều nơi trong nước [1]. Đứng trước sự du nhập của nhiều giống gà ngoại, các giống gà bản địa như gà Tre đứng trước nguy cơ bị giảm nhanh số lượng do nhu cầu thị hiếu. Bên cạnh đó, trong bối cảnh dự báo nguy cơ bùng phát các dịch bệnh trên động vật tiếp tục gia tăng trong tương lai gần, việc bảo tồn và phục hồi nhanh nguồn gen vật nuôi bản địa trở thành yêu cầu cấp thiết [2]. Trong đó, kỹ thuật bảo quản tinh trùng gia cầm đóng vai trò quan trọng trong duy trì đa dạng di truyền, nâng cao hiệu quả sinh sản và hỗ trợ các chương trình nhân giống quy mô lớn [3]. Việc nghiên cứu và tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng tinh trùng trong quá trình bảo quản không chỉ góp phần cải thiện tỷ lệ thụ tinh mà còn nâng cao hiệu quả ứng dụng các phương pháp thụ tinh nhân tạo trong thực tiễn chăn nuôi gia cầm [4].

Để duy trì hoạt động của tinh trùng trong quá trình bảo quản, môi trường pha loãng đóng vai trò quan trọng trong việc cung cấp năng lượng và bảo vệ tinh trùng khỏi những tác động bất lợi như pH, nhiệt độ, stress oxy hóa. Trong quá trình bảo quản lâu dài [5]. Nhiều môi trường bảo quản khác nhau, bao gồm natri citrat-fructose-lòng đỏ, natri citrat-lòng đỏ, saccharose - EDTA, và nước muối, đã được sử dụng trong phòng thí nghiệm

để bảo quản tinh trùng [6]. Môi trường bảo quản lý tưởng phải có khả năng cung cấp năng lượng cho quá trình trao đổi chất của tinh trùng, duy trì độ thẩm thấu và pH, những yếu tố cần thiết để duy trì khả năng sống và chức năng của tế bào [5, 7]. Tinh trùng gà có thể chịu được phạm vi độ pH từ 6,0 đến 8,0 [8] và duy trì khả năng thụ tinh trong môi trường có độ thẩm thấu từ 250 đến 460 mOsm/kg, mặc dù áp suất thẩm thấu lý tưởng là 325 đến 350 mOsm/kg [9]. Hiện nay, nhiều loại môi trường pha loãng đã được phát triển và ứng dụng trong bảo quản tinh dịch gia cầm đông lạnh, bao gồm Lake và Ravie (LR) [10], BHSV [11], Beltsville [12] và EK [13]. Thành phần cơ bản của các môi trường này thường bao gồm dipotassium phosphate, natri glutamat, fructose và natri axetat, cùng với các chất đệm và muối nhằm duy trì áp suất thẩm thấu và pH thích hợp cho tinh trùng. Tuy nhiên, các biến đổi nhỏ về thành phần và nồng độ giữa các môi trường có thể ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả bảo quản, do tương tác phức tạp giữa các chất hòa tan và dung môi. Nhiều nghiên cứu đã xác nhận rằng cả loại môi trường và thời gian bảo quản đều là những yếu tố then chốt ảnh hưởng đến chất lượng tinh trùng sau lưu trữ [14, 15].

Pha loãng tinh dịch là một bước thiết yếu trong quy trình bảo quản, có ảnh hưởng trực tiếp đến nồng độ tinh trùng và chất lượng tinh dịch sau lưu trữ. Việc pha loãng đúng cách giúp hạn chế suy giảm chất nền, tích tụ sản phẩm trao đổi chất và biến đổi trạng thái vật lý của tinh dịch trong quá trình bảo quản [16]. Tỷ lệ pha loãng

phụ thuộc vào mật độ tinh trùng ban đầu, và có sự khác biệt rõ rệt giữa các loài và cá thể. Ở cá, tỷ lệ pha loãng thường dao động từ 1:2 đến 1:10, trong đó tỷ lệ 1:10 được xem là hiệu quả hơn [17]. Với cừu đực, các nghiên cứu áp dụng tỷ lệ từ 1:1 đến 1:16; tuy việc tăng tỷ lệ pha loãng không ảnh hưởng đến khả năng di động, nhưng lại làm giảm đáng kể tỷ lệ tinh trùng sống [18]. Đối với gia cầm, tỷ lệ từ 1:1 đến 1:4 thường được khuyến nghị [19, 20], mặc dù một số nghiên cứu ghi nhận không có sự khác biệt đáng kể về khả năng sinh sản giữa các tỷ lệ này [21].

Bên cạnh áp suất thẩm thấu và pH, mật số tinh trùng sau pha loãng cũng là yếu tố quan trọng quyết định hiệu quả thụ tinh nhân tạo ở gia cầm. Nhiều nghiên cứu cho thấy mật số tinh trùng quá thấp có thể làm giảm xác suất tinh trùng tiếp cận và thụ tinh với noãn, trong khi mật số quá cao lại làm gia tăng cạnh tranh trao đổi chất, tích lũy các sản phẩm chuyển hóa và stress oxy hóa, từ đó ảnh hưởng tiêu cực đến chất lượng tinh trùng trong quá trình bảo quản [8, 9]. Theo Blesbois [8], mật số tinh trùng hiệu quả cho thụ tinh nhân tạo ở gà thường dao động trong khoảng $100\text{--}200 \times 10^6$ tinh trùng/liều, tùy thuộc vào giống và điều kiện bảo quản. Các nghiên cứu khác cũng ghi nhận rằng việc duy trì mật số tinh trùng trong ngưỡng tối ưu giúp cải thiện tỷ lệ thụ tinh và kéo dài thời gian duy trì chất lượng tinh trùng trong điều kiện bảo quản lạnh [14, 20]. Do đó, việc lựa chọn tỷ lệ pha loãng phù hợp không chỉ nhằm duy trì cân bằng thẩm thấu và pH của môi trường, mà còn để đảm bảo mật số tinh trùng đạt ngưỡng cần thiết cho hiệu quả sinh sản trong thực tiễn.

Trên cơ sở đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định tỷ lệ pha loãng và thời gian bảo quản hiệu quả cho tinh trùng gà Tre ở 5 °C.

2 Vật liệu và phương pháp

2.1 Động vật

Sáu con gà Tre trống khỏe mạnh trên 6 tháng tuổi được chăm sóc chu đáo tại trang trại động vật thí nghiệm của Phòng thí nghiệm Tế bào gốc, Đại học Cần Thơ. Gà được nuôi riêng theo từng chuồng có kích thước $30 \times 30 \times 60$ cm (dài \times rộng \times cao), đảm bảo thoáng khí và được vệ sinh thường xuyên. Trong nghiên cứu này, toàn bộ gà Tre thí nghiệm được nuôi dưỡng bằng thức ăn hỗn hợp thương mại dành cho gà sinh sản, đáp ứng đầy đủ nhu cầu dinh dưỡng theo khuyến cáo. Chế độ ăn được áp dụng đồng nhất cho tất cả cá thể và duy trì ổn định trong suốt thời gian nghiên cứu, không bổ sung hoặc hạn chế dinh dưỡng. Nghiên cứu được sự chấp thuận về mặt đạo đức theo quy định của Hội đồng Tư vấn đạo đức trong nghiên cứu động vật Trường Đại học Cần Thơ (mã số: CTU-AEC25022).

2.2 Thiết kế thí nghiệm

Mẫu tinh dịch được thu nhận từ 6 con gà trống khỏe mạnh bằng phương pháp massage vùng lưng dưới và hai bên hông, sau đó tập trung massage vùng bụng dưới và khu vực xung quanh huyệt (cloaca), mỗi tuần một lần. Sau đó, mẫu tinh dịch của 6 con được trộn đều với nhau để đồng nhất, sau đó pha loãng với môi trường bảo quản SCE (gồm Sodium glutamate, Potassium citrate, Sodium acetate, Magnesium acetate và Glucose) với 4 tỷ lệ pha loãng là 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 (Bảng 1). Mẫu tinh dịch sau đó được bảo quản ở 5 °C và chất lượng tinh trùng được đánh giá lần lượt tại các thời điểm 0 giờ, 3 giờ, 6 giờ, 9 giờ và 12 giờ. Chất lượng tinh trùng được đánh giá dựa trên các tiêu chí sau: di động tổng số (total motility), di động tiến tới (progressive motility), khả năng sống, tính toàn vẹn màng tế bào và tính toàn vẹn acrosome.

2.3 Đánh giá độ di động tinh trùng

Sự di động của tinh trùng được quan sát dưới kính hiển vi Eclipse Si (Nikon) với độ phóng đại 40× ở nhiệt độ 37 °C. Sự di động của tinh trùng được chia thành di động tiến tới (tinh trùng

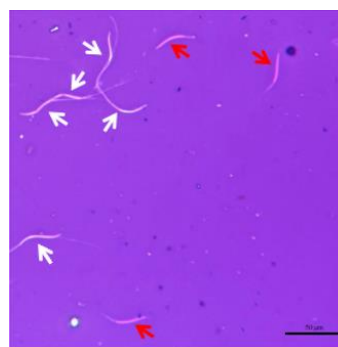
di chuyển theo hướng xác định) và di động tổng số (bao gồm tinh trùng di động tiến tới và không tiến tới) [22]. Mỗi vi trường đếm tối thiểu 100 tinh trùng.

Bảng 1. Số liệu thể tích tinh dịch và nồng độ tinh trùng của mẫu tinh dịch gộp từ 6 con gà Tre thí nghiệm và trong các nghiệm thức với tỷ lệ pha loãng khác nhau.

Mẫu	Thể tích	Nồng độ tinh trùng	Số tinh trùng/liều ($\times 10^6$ tinh trùng/liều)	Số liều pha loãng được từ mẫu tinh gộp
Mẫu tinh gộp từ 6 con gà Tre	2,53 mL	$1,84 \times 10^9$ tinh trùng/mL		
Mẫu pha loãng tỷ lệ 1:4	0,5 mL	$0,46 \times 10^9$ tinh trùng/mL	230	20 liều
Mẫu pha loãng tỷ lệ 1:6	0,5 mL	$0,31 \times 10^9$ tinh trùng/mL	155	30 liều
Mẫu pha loãng tỷ lệ 1:8	0,5 mL	$0,23 \times 10^9$ tinh trùng/mL	115	40 liều
Mẫu pha loãng tỷ lệ 1:10	0,5 mL	$0,18 \times 10^9$ tinh trùng/mL	92	60 liều

2.4 Đánh giá tỷ lệ sống của tinh trùng

Tỷ lệ sống của tinh trùng được đánh giá theo phương pháp Eosin-Nigrosin [23], tinh trùng chết sẽ có màu tím, trong khi tinh trùng sống sẽ không bắt màu. Tinh trùng được quan sát dưới kính hiển vi Eclipse Si (Nikon) độ phóng đại 40× (Hình 1). Mỗi vi trường đếm tối thiểu 100 tinh trùng.



Hình 1. Hình ảnh nhuộm Eosin–Nigrosin đánh giá tỷ lệ sống của tinh trùng gà Tre. Tinh trùng chết bắt màu tím (mũi tên đỏ), tinh trùng sống không bắt màu (mũi tên trắng). Thanh tỷ lệ: 50 μ m

2.5 Đánh giá tính toàn vẹn màng tế bào

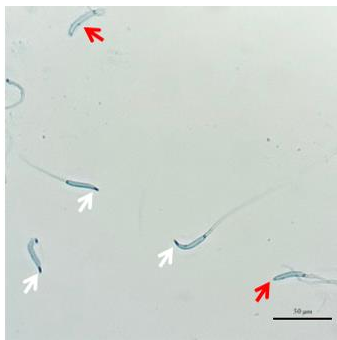
Tính toàn vẹn màng tế bào tinh trùng được xác định dựa trên thử nghiệm sưng tấy giảm thẩm thấu [24]. 5 μ L tinh trùng được trộn đều với 45 μ L dung dịch HOS (Hypo Osmotic Swelling - gồm 0,05g Sodium citrate và 0,43g sucrose), ủ 37 °C trong 30 phút. Dung dịch mẫu đã trộn được quan sát dưới kính hiển vi Eclipse Si (Nikon) độ phóng đại 40×. Tinh trùng còn nguyên vẹn màng có biểu hiện cong đuôi, trong khi đó tinh trùng với màng bị hư hỏng không biểu hiện (Hình 2). Mỗi vi trường đếm tối thiểu 100 tinh trùng.



Hình 2. Hình ảnh đánh giá tính toàn vẹn màng tinh trùng gà Tre. Tinh trùng có màng nguyên vẹn biểu hiện cong đuôi (mũi tên đỏ), trong khi tinh trùng có màng bị tổn thương không xuất hiện hiện tượng này (mũi tên trắng). Thanh tỷ lệ: 50 μ m

2.6 Đánh giá tính toàn vẹn acrosome

Tính toàn vẹn của acrosome tinh trùng được đánh giá bằng phương pháp nhuộm với Coomassie Brilliant Blue (CBB) nồng độ 0,08% [25]. Tinh trùng có acrosome nguyên vẹn sẽ bắt màu xanh của CBB khi quan sát dưới kính hiển vi Eclipse Si (Nikon) ở độ phóng đại 40×. Tinh trùng có acrosome bị tổn thương sẽ không có màu xanh (Hình 3). Mỗi vi trường đếm tối thiểu 100 tinh trùng.



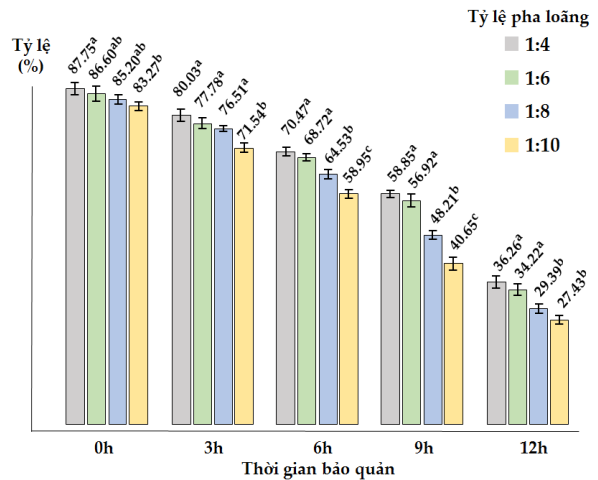
Hình 3. Hình ảnh nhuộm Coomassie Brilliant Blue đánh giá tính toàn vẹn acrosome của tinh trùng gà Tre. Tinh trùng có acrosome nguyên vẹn bắt màu xanh ở phần đầu (mũi tên trắng), trong khi tinh trùng có acrosome bị tổn thương không bắt màu này (mũi tên đỏ). Thanh tỷ lệ: 50 μm

2.7 Phân tích thống kê

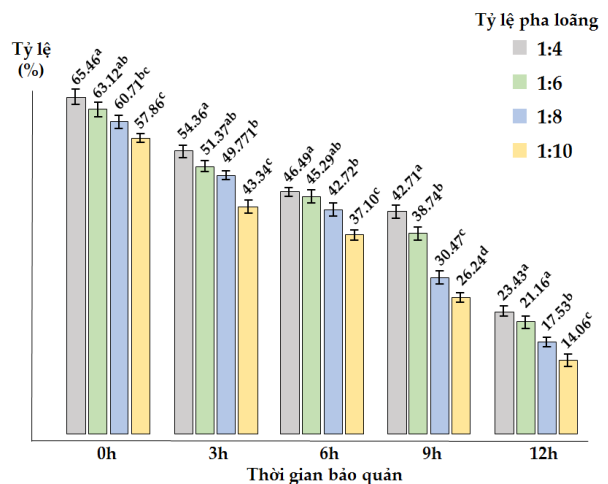
Phương pháp One-way ANOVA được sử dụng để phân tích dữ liệu, sau đó so sánh giá trị trung bình giữa các nghiệm thức bằng phương pháp Tukey trong phần mềm R.4.3.1. Các kết quả được trình bày ± độ lệch chuẩn (SD). Ý nghĩa thống kê được đặt ở $p < 0,05$ cho thấy mức độ đáng tin cậy cao đối với kết quả thu được.

3 Kết quả và thảo luận

Kết quả đánh giá chất lượng tinh trùng gà Tre theo thời gian bảo quản ở 5 °C được thể hiện ở Hình 4, Hình 5, Hình 6, Hình 7 và Hình 8. Kết quả cho thấy chất lượng tinh trùng gà giảm dần theo thời gian bảo quản.

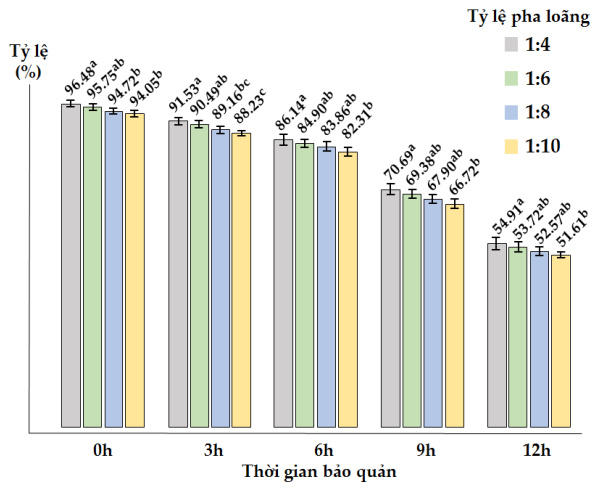


Hình 4. Khả năng di động tổng số của tinh trùng theo thời gian. ^{a, b, c} Các giá trị có chữ số mũ khác nhau biểu thị số liệu khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở mỗi mốc thời điểm đánh giá



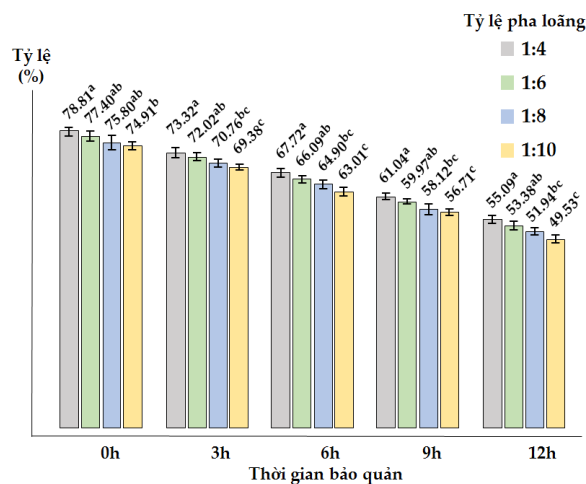
Hình 5. Khả năng di động tiến tới của tinh trùng theo thời gian. ^{a, b, c} Các giá trị có chữ số mũ khác nhau biểu thị số liệu khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở mỗi mốc thời điểm đánh giá

Sau 12 giờ bảo quản, tỷ lệ di động tổng số và di động tiến tới của tinh trùng gà được ghi nhận cao nhất ở nghiệm thức pha loãng tỷ lệ 1:4 (Hình 4 và 5). Tuy nhiên, sự khác biệt về độ di động giữa tỷ lệ pha loãng 1:4 và 1:6 không có ý nghĩa thống kê sau 12 giờ bảo quản ($p > 0,05$). Độ di động chung và độ di động tiến tới của tinh trùng thấp nhất được ghi nhận ở nghiệm thức pha loãng tỷ lệ 1:10, khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các tỷ lệ pha loãng khác.

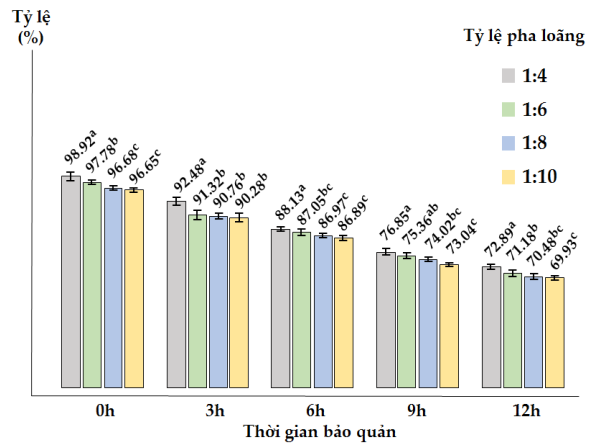


Hình 6. Tỷ lệ sống của tinh trùng theo thời gian. ^{a, b, c} Các giá trị có chữ số mũ khác nhau biểu thị số liệu khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở mỗi mốc thời điểm đánh giá

Kết quả trình bày trong Hình 6 ghi nhận sự thay đổi của tỷ lệ sống tinh trùng giữa các tỷ lệ pha loãng theo thời gian. Tại các thời điểm đánh giá, tỷ lệ pha loãng 1:4 đều ghi nhận tỷ lệ sống của tinh trùng cao nhất. Sau 12 giờ bảo quản, tỷ lệ sống của tinh trùng ở nghiệm thức pha loãng tỷ lệ 1:4 là 54,91% và khác biệt không có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức pha loãng tỷ lệ 1:6.



Hình 7. Tính toàn vẹn màng tế bào tinh trùng theo thời gian. ^{a, b, c} Các giá trị có chữ số mũ khác nhau biểu thị số liệu khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở mỗi mốc thời điểm đánh giá



Hình 8. Tính toàn vẹn acrosome tinh trùng theo thời gian. ^{a, b, c, d} Các giá trị có chữ số mũ khác nhau biểu thị số liệu khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) ở mỗi mốc thời điểm đánh giá

Hình 7 và Hình 8 trình bày kết quả đánh giá tính toàn vẹn màng tế bào và acrosome của tinh trùng gà Tre bảo quản ở 5 °C theo thời gian. Sau 12 giờ bảo quản, tỷ lệ toàn vẹn màng cao nhất (55,09%) được ghi nhận ở nghiệm thức pha loãng tỷ lệ 1:4, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với nghiệm thức 1:6. Tỷ lệ pha loãng 1:4 cũng cho kết quả tính toàn vẹn acrosome cao nhất (72,89%), khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại.

Phân tích định lượng sự suy giảm chất lượng tinh trùng theo thời gian cho thấy tốc độ giảm các chỉ tiêu phụ thuộc rõ rệt vào tỷ lệ pha loãng. Trong nghiên cứu này, ở các tỷ lệ pha loãng 1:4 và 1:6, độ di động tổng số và di động tiến tới của tinh trùng giảm tương đối chậm trong 6 giờ đầu bảo quản, trong khi ở các tỷ lệ pha loãng cao hơn (1:8 và 1:10), mức suy giảm diễn ra nhanh hơn và rõ rệt hơn. Xu hướng này phù hợp với các báo cáo trước đây trên tinh trùng gia cầm, trong đó chất lượng tinh trùng giảm dần theo thời gian bảo quản lạnh và tốc độ suy giảm chịu ảnh hưởng đáng kể bởi môi trường bảo quản và mức độ pha loãng [9, 14].

Đối với tính toàn vẹn màng tế bào, các nghiệm thức pha loãng 1:4 và 1:6 duy trì tỷ lệ toàn

ven màng cao hơn so với 1:8 và 1:10 trong suốt thời gian bảo quản, đặc biệt tại các thời điểm 9–12 giờ. Theo Blesbois [8], tinh trùng gia cầm có cấu trúc màng giàu phospholipid không bão hòa, do đó rất nhạy cảm với các biến động của môi trường ngoại bào trong quá trình pha loãng và bảo quản lạnh. Việc pha loãng ở mức quá cao có thể làm gia tăng dòng trao đổi nước và ion qua màng tế bào, dẫn đến rối loạn cấu trúc màng và suy giảm chức năng sinh lý của tinh trùng.

So sánh giữa các tỷ lệ pha loãng cho thấy mặc dù tỷ lệ 1:4 cho các giá trị tuyệt đối cao nhất ở một số chỉ tiêu sau 12 giờ bảo quản, sự khác biệt so với tỷ lệ 1:6 không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Kết quả này cho thấy hai tỷ lệ pha loãng này cho hiệu quả bảo vệ tinh trùng tương đương trong môi trường SCE, đồng thời phù hợp với các nghiên cứu trước đó trên tinh trùng gà và các loài gia cầm khác, trong đó các tỷ lệ pha loãng trung gian thường mang lại hiệu quả bảo quản tốt hơn so với pha loãng quá thấp hoặc quá cao [9, 14, 20]. Xét trên cả khía cạnh duy trì chất lượng tinh trùng theo thời gian và hiệu quả sử dụng tinh dịch cho thụ tinh nhân tạo, tỷ lệ pha loãng 1:6 được xem là tối ưu hơn trong điều kiện nghiên cứu này, do vừa đảm bảo chất lượng tinh trùng vừa cho phép tăng số lượng liều tinh dịch sử dụng trong thực tiễn (Bảng 1). Đáng chú ý, sau 9 giờ bảo quản ở tỷ lệ 1:6, các chỉ tiêu chất lượng tinh trùng cho thấy tiềm năng ứng dụng trong bảo quản tinh trùng phục vụ gieo tinh nhân tạo (di động tiến tới > 35%, tỷ lệ sống > 65%). Cụ thể, tỷ lệ di động tổng số đạt 56,92%, di động tiến tới đạt 38,74%, tỷ lệ sống đạt 69,38%, tính toàn vẹn màng đạt 59,97% và tính toàn vẹn acrosome đạt 75,36%.

Sự suy giảm chất lượng tinh trùng theo thời gian bảo quản có thể được giải thích bởi tác động tổng hợp của stress oxy hóa, mất cân bằng nhiệt và rối loạn áp suất thẩm thấu, cùng với các quá trình thoái hóa liên quan đến lão hóa tế bào [26]. Trong quá trình bảo quản lạnh, sự tích lũy các gốc oxy phản ứng (ROS) là một trong những cơ chế

chính gây tổn thương tinh trùng. ROS có thể gây peroxy hóa lipid màng, biến tính protein và tổn thương DNA, từ đó làm suy giảm chức năng tế bào. Bên cạnh đó, các biến động nhiệt độ trong khâu xử lý và bảo quản có thể gây chuyển pha trong lớp kép lipid, dẫn đến sốc lạnh hoặc stress nhiệt, làm mất ổn định màng tế bào và biến tính protein [27]. Đồng thời, sự thay đổi áp suất thẩm thấu trong quá trình pha loãng có thể phá vỡ cân bằng thẩm thấu nội – ngoại bào, gây hiện tượng trương hoặc co tế bào, từ đó làm tổn thương cấu trúc màng và làm giảm khả năng thích ứng của tinh trùng với môi trường bảo quản [28]. Khi thời gian bảo quản kéo dài, các hệ thống chống oxy hóa nội bào như glutathione bị tiêu hao, trong khi hoạt động của các enzyme phân giải lipid màng, điển hình là phospholipase, có xu hướng gia tăng, góp phần làm suy giảm nghiêm trọng tính toàn vẹn màng tế bào [24].

Sự khác biệt về chất lượng tinh trùng giữa các tỷ lệ pha loãng trong nghiên cứu này có thể được giải thích bởi sự thay đổi đồng thời của áp suất thẩm thấu, mật số tinh trùng và cường độ trao đổi chất trong môi trường bảo quản. Ở các tỷ lệ pha loãng thấp hơn (1:4 và 1:6), môi trường bảo quản có khả năng duy trì áp suất thẩm thấu gần với ngưỡng sinh lý tối ưu của tinh trùng gà, giúp hạn chế rối loạn cấu trúc màng và làm giảm mức độ nhạy cảm của tinh trùng đối với stress oxy hóa. Ngược lại, ở các tỷ lệ pha loãng cao hơn (1:8 và 1:10), sự rối loạn cân bằng thẩm thấu kết hợp với mật số tinh trùng thấp hơn có thể làm giảm hiệu quả “đệm sinh học” của tinh dịch, từ đó thúc đẩy quá trình mất cân bằng nội môi và làm tăng tốc độ suy giảm các chỉ tiêu chất lượng theo thời gian [8, 9, 14, 26]. Trong nghiên cứu này, áp suất thẩm thấu của các nghiệm thức chưa được đo trực tiếp; do đó, các phân tích trên chủ yếu dựa trên cơ sở lý thuyết và các kết quả đã được công bố. Tuy nhiên, sự khác biệt rõ rệt về chất lượng tinh trùng giữa các tỷ lệ pha loãng cho thấy vai trò quan trọng của cân bằng thẩm thấu trong việc duy trì

chức năng tinh trùng gà Tre trong điều kiện bảo quản ở 5 °C. Các nghiên cứu tiếp theo cần đo trực tiếp áp suất thẩm thấu của môi trường pha loãng nhằm làm rõ hơn mối liên hệ định lượng giữa tỷ lệ pha loãng, áp suất thẩm thấu và chất lượng tinh trùng.

Nghiên cứu này bước đầu xác định được tỷ lệ pha loãng và thời gian bảo quản tối ưu cho tinh trùng gà Tre ở 5 °C. Tuy nhiên, thời gian duy trì chất lượng tinh trùng vẫn còn hạn chế và chưa đạt mức bảo quản dài ngày. Do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần tập trung đánh giá hiệu quả của việc bổ sung các chất chống oxy hóa hoặc các phụ gia bảo vệ màng vào môi trường pha loãng nhằm kéo dài thời gian bảo quản. Bên cạnh đó, tinh dịch trong nghiên cứu này được trộn từ nhiều cá thể gà trống nhằm giảm thiểu sai khác cá thể và tập trung đánh giá ảnh hưởng của tỷ lệ pha loãng; cách tiếp cận này có thể làm mất đi thông tin về sự biến thiên chất lượng tinh trùng giữa các cá thể. Do vậy, các nghiên cứu trong tương lai nên xem xét đánh giá riêng lẻ tinh trùng của từng cá thể để phục vụ tốt hơn cho công tác chọn lọc và bảo tồn nguồn gen. Một hạn chế khác của nghiên cứu là các đánh giá chỉ dừng lại ở các chỉ tiêu chất lượng tinh trùng *in vitro*. Mặc dù các chỉ tiêu này phản ánh tiềm năng thụ tinh của tinh trùng, chúng chưa thể thay thế hoàn toàn cho kết quả thụ tinh thực tế *in vivo*; do đó, các nghiên cứu tiếp theo cần được tiến hành thông qua gieo tinh nhân tạo nhằm đánh giá tỷ lệ thụ tinh và khả năng nở của trứng, qua đó xác nhận mối liên hệ giữa các chỉ tiêu *in vitro* và hiệu quả sinh sản thực tế của tinh trùng gà Tre.

4 Kết luận

Tinh trùng gà Tre bảo quản ở 5 °C với tỷ lệ pha loãng 1:6 trong môi trường SCE duy trì chất lượng ở mức chấp nhận được đến 9 giờ, với các chỉ tiêu đạt: di động tổng số 56,92%, di động tiến

tới 38,74%, tỷ lệ sống 69,38%, tính toàn vẹn màng 59,97% và tính toàn vẹn acrosome 75,36%.

Lời cảm ơn

Đề tài này được tài trợ bởi Trường Đại học Cần Thơ, Mã số: TSV2025-214

Tài liệu tham khảo

1. Ngo TKC, Esatu W, Hoang HH, Vu CT, Nguyen CD, Ninh TH, et al. Monograph on indigenous chicken breeds/ecotypes in Vietnam. ILRI Res Rep. 2025;(123):1-21.
2. Trần TTK, Lâm PT, Nguyễn TTK, Nguyễn TN, Dương NDT. Cryobank: Giải pháp khôi phục nhanh đàn vật nuôi sau dịch bệnh. Tạp chí Khoa học Đại học Cần Thơ. 2022;58(SDMD):104-114.
3. Arif A, Zahoor N, Tang J, Tang M, Dong L, Khan SZ, et al. Cryopreservation strategies for poultry semen: a comprehensive review of techniques and applications. Vet Sci. 2025;12(2):145.
4. Izanloo H, Soleimanzadeh A, Bucak MN, Imani M, Zhandi M. The effects of glutathione supplementation on post-thawed turkey semen quality and oxidative stress parameters and fertilization, and hatching potential. Theriogenology. 2022;179:32-8.
5. Bustani GS, Baiee FH. Semen extenders: an evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. Vet World. 2021;14(5):1220-33.
6. Thiangthientham P, Kallayanatham W, Juntautsa S, Leethongdee S. Sesame oil as a partial substitute for egg yolk in goat semen extenders. Animal Reproduction Science. 2024;266:107500.
7. Prell MJ, McCue PM, Moffett PD, Graham JK. Motility and fertility evaluation of thawed frozen stallion semen after 24 hours of cooled storage. J Equine Vet Sci. 2020;90:102983.
8. Blesbois E. Biological features of the avian male gamete and their application to biotechnology of conservation. J Poult Sci. 2012;49:141-9.
9. Siudzińska A, Łukaszewicz E. Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. J Appl Poult Res. 2008;17:101-8.

10. Lake PE, Ravie O. An exploration of cryoprotective compounds for fowl spermatozoa. *Br Poult Sci.* 1984;25:145-50.
11. Seigneurin F, Grasseau I, Chapuis H, Blesbois E. An efficient method of guinea fowl sperm cryopreservation. *Poult Sci.* 2013;92:2988-96.
12. Siari S, Mehri M, Sharafi M. Supplementation of Beltsville extender with quercetin improves the quality of frozen-thawed rooster semen. *Br Poult Sci.* 2021;63:252-60.
13. Kowalczyk AM, Klećkowska-Nawrot J, Łukaszewicz ET. Effect of selenium and vitamin E addition to the extender on liquid stored capercaillie (*Tetrao urogallus*) semen quality. *Reproduction in Domestic Animals.* 2017;52(4):603-9.
14. Chankitisakul V, Boonkum W, Kaewkanha T, Pimprasert M, Ratchamak R, Authaida S, et al. Fertilizing ability and survivability of rooster sperm diluted with a novel semen extender supplemented with serine for practical use on smallholder farms. *Poultry Science.* 2022;101(12):102188.
15. Duy NLK, Liêm BT, Vy NPN, Khuong TTT. Ảnh hưởng của môi trường bảo quản và thời gian bảo quản đến chất lượng tinh trùng dê. *TNU J Sci Technol.* 2024;229(05):227-34.
16. Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science.* 2000;62(1):77-111.
17. Viveiros ATM, Leal MC. Sperm dilution ratio affects post-thaw motility rate and velocity of *Prochilodus lineatus* (Characiformes) sperm. *Zygote.* 2016;24(5):662-7.
18. Bonato M, Smith MAMJ, Malecki IA, Cloete SWP. The effect of dilution rate and successive semen collections on sperm quality and sexual motivation of sexually mature South African Merino rams. *Tropical Animal Health and Production.* 2021;53(1):182.
19. Di Iorio M, Rusco G, Iampietro R, Colonna MA, Zaniboni L, Cerolini S, et al. Finding an effective freezing protocol for turkey semen: benefits of ficoll as non-permeant cryoprotectant and 1:4 as dilution rate. *Animals.* 2020;10(3):421.
20. Santiago-Moreno J, Castaño C, Toledano-Díaz A, Coloma MA, López-Sebastián A, Prieto MT, et al. Semen cryopreservation for the creation of a Spanish poultry breeds cryobank: Optimization of freezing rate and equilibration time¹. *Poultry Science.* 2011;90(9):2047-53.
21. Pérez-Marín CC, Arando A, Mora C, Cabello A. Fertility after insemination with frozen-thawed sperm using N-methylacetamide extender on the Combatiente Español avian breed. *Animal Reproduction Science.* 2019;208:106111.
22. Longobardi V, Zullo G, Salzano A, De Canditiis C, Cammarano A, De Luise L, et al. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves *in vitro* fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology.* 2017;88:1-8.
23. Abioja MO, Abiona JA, Oke OE, Ewuola EO, Oso AO, Sogunle OM, et al. Dietary vitamin E improves sperm cell morphology and membrane integrity in broiler breeder chickens. *Rev Bras Cienc Avic.* 2022;24(1):1-8.
24. Bezerra LGP, Silva AM, Moreira SSJ, de Souza CMP, Silva AR. Establishment of methods to analyze the structural and functional integrity of the quail (*Coturnix coturnix japonica*) sperm plasma membrane. *British Poultry Science.* 2023;64(3):429-34.
25. Kim SW, Lee J-Y, Kim C-L, Ko YG, Kim B. Evaluation of rooster semen quality using CBB dye based staining method. *J Anim Reprod Biotechnol.* 2022;37(1):55-61.
26. Zong Y, Li Y, Sun Y, Mehaisen GMK, Ma T, Chen J. Chicken sperm cryopreservation: review of techniques, freezing damage, and freezability mechanisms. *Agriculture.* 2023;13(2):445.
27. Partyka A, Łukaszewicz E, Nizański W. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in avian semen. *Animal Reproduction Science.* 2012;134(3):184-90.
28. Partyka A, Bonarska-Kujawa D, Sporniak M, Strojcki M, Nizański W. Modification of membrane cholesterol and its impact on frozen-thawed chicken sperm characteristics. *Zygote.* 2016;24(5):714-23.