

NGHIÊN CỨU BẢO QUẢN TINH TRÙNG CÁ CHÊM MỠM NHỌN (*Psammoperca waigiensis*) TRONG TỦ LẠNH

STUDY ON SPERM CRYOPRESERVATION OF WAIGIEU SEAPERCH (*Psammoperca waigiensis*) IN REFRIGERATOR

Lê Minh Hoàng*, Bông Minh Đương, Mai Như Thủy, Phạm Phương Linh, Phạm Quốc Hùng
Khoa Nuôi trồng Thủy sản – Trường Đại học Nha Trang

*Email: hoanglm@ntu.edu.vn

ABSTRACT

The objectives of this study were to find the optimal conditions for sperm cryopreservation of waigieu seaperch (*Psammoperca waigiensis*): extender, dilution ratio and temperature. Semen was diluted in different extenders (RSW, MHer, RFS, and ASP) at dilution ratios of 1:1, 1:3, 1:5 and 1:10 (semen: extender) and preserved in refrigerator at 0, 2 and 4°C. Results showed that the most effective conditions for preservation of waigieu seaperch sperm were ASP in dilution ratio of 1:3 at 2°C, in which the preserved sperm maintained motility for 24 days. These results demonstrate that spermatozoa of waigieu seaperch can be preserved.

Key words: Waigieu seaperch, *Psammoperca waigiensis*, sperm preservation, extender, antibiotic.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Việc nghiên cứu bảo quản tinh trùng của động vật trên cạn đã được thực hiện từ lâu. Đến nay, các kết quả nghiên cứu đã được ứng dụng vào sản xuất và đã mang lại nhiều lợi ích kinh tế cho ngành chăn nuôi gia súc, có ý nghĩa lớn trong việc lai, chọn giống, lưu giữ nguồn gen (Đàm Bá Long, 2005). Bảo quản và lưu giữ tinh trùng cá trong tủ lạnh là biện pháp hữu hiệu để lưu giữ nguồn gen nguyên liệu di truyền của cá bố mẹ, loài cá có giá trị kinh tế, loài có nguy cơ tuyệt chủng, giảm chi phí và các rủi ro gây thất thoát cá bố mẹ.

Cá chêm mỡ nhờn (*Psammoperca waigiensis*) là loài cá biển có giá trị kinh tế, đã và đang nuôi rộng rãi trên thế giới. Là đối tượng được liệt kê vào danh mục các loài cá biển có giá trị kinh tế (Vũ Văn Toàn, 2002) và đã nghiên cứu sinh sản nhân tạo thành công bước đầu (Nguyễn Trọng Nho và ctv., 2003). Đặc biệt, cá chêm mỡ nhờn là loài có đặc tính biến đổi giới tính, con đực có thể chuyển thành con cái. Ngoài ra, loài cá này không đồng pha trong sinh sản nhân tạo như thu được tinh trùng trong khi đổ trứng lại chưa đạt mức độ thành thực. Đây là một trở ngại lớn trong công tác cho sinh sản nhân tạo khi không chủ động được sự đồng pha giữa con đực và con cái. Chính vì vậy, việc nghiên cứu bảo quản và lưu giữ tế bào sinh dục thành thực nói chung và tinh trùng cá này nói riêng trong tủ lạnh là giải pháp tốt cho việc chủ động sinh sản nhân tạo.

Trên thế giới cũng như Việt Nam, đã có rất nhiều công trình nghiên cứu bảo quản lạnh tinh trùng của một số loài cá đã được công bố như cá hồi (Stoss và ctv., 1983), cá tra (Christensen và ctv., 1996), cá tầm (Park và ctv., 2005), cá đù vàng (Le và ctv., 2011)... Tuy nhiên, vẫn chưa có nghiên cứu nào về bảo quản tinh trùng cá chêm mỡ nhờn. Chính vì thế, “nghiên cứu bảo quản tinh trùng cá chêm mỡ nhờn *Psammoperca waigiensis* trong tủ lạnh” có ý nghĩa rất quan trọng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Quản lý cá đực và thụ tinh

Cá đực được chăm sóc và nuôi dưỡng tại lồng nuôi cho đến khi cá thành thực sinh dục tốt. Đây là đàn cá bố mẹ thuộc đề tài nghiên cứu do Quỹ phát triển khoa học và công nghệ quốc

gia tài trợ (106.08-2011.55). Thức ăn được sử dụng là cá tạp với khẩu phần ăn là 5% khối lượng cơ thể. Cá được đưa vào nghiên cứu phải thành thực sinh dục, ngoại hình tươi sáng, khỏe mạnh, không bị dị tật, và tiến hành thụ tinh.

Trước khi vuốt tinh, tiến hành gây mê cá được bằng Methylene glycol 200 ppm. Sau đó dùng khăn lau sạch xung quanh lỗ sinh dục giúp tránh việc lẫn tạp nhằm thu được mẫu đạt chất lượng. Dùng tay vuốt nhẹ bụng cá từ từ cho tinh dịch chảy ra vào eppendorf tube 1,5 ml đã được vô trùng và khô. Cần thận khi vuốt tinh không để lẫn máu, nước tiểu để thu được tinh có chất lượng tốt. Tinh thu xong được giữ trên đá bào và tiến hành nghiên cứu tại phòng thí nghiệm.

Đánh giá chất lượng tinh

Tinh dịch được pha loãng trong nước biển nhân tạo với tỷ lệ 1:100 (1 μ l tinh dịch và 99 μ l nước biển nhân tạo), sau đó dùng micropipette hút 1 μ l hỗn hợp trên đặt lên lam kính và quan sát dưới kính hiển vi có kết nối với camera. Những mẫu có trên 85% tinh trùng hoạt động được đưa vào nghiên cứu.

Thí nghiệm ảnh hưởng của chất bảo quản đến thời gian bảo quản trong tủ lạnh

Để xác định chất bảo quản tốt nhất cho bảo quản tinh trùng cá ta tiến hành bảo quản tinh trùng trong 4 chất bảo quản sau: RSW, MHer, RFS, ASP ở tỷ lệ 1:1, 1:3, 1:5 và 1:10 (tinh dịch:chất bảo quản). Thành phần các chất bảo quản sử dụng để bảo quản tinh trùng trong tủ lạnh được thể hiện ở Bảng 1. Tinh trùng sau khi pha loãng trong các chất bảo quản được cho vào các tube và bảo quản trong tủ lạnh ở 0, 2 và 4°C. Hoạt lực của tinh trùng được tiến hành đánh giá sau 3 ngày một lần; chẳng hạn như: ngày thứ 3, 6, 9... cho đến khi tinh trùng ngừng hoạt động.

Bảng 1. Thành phần của các chất bảo quản trong 100ml nước cất

Thành phần	Chất bảo quản			
	RSW	RFW	M Her	ASP
NaCl	0,75	0,675	0,6	0,5
NaH ₂ PO ₄	-	-	-	0,02
NaHCO ₃	0,02	0,0015	0,004	0,01
KCl	0,02	0,03	0,025	0,04
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,0265	0,0175	0,02	0,01
MgCl ₂ .6H ₂ O	-	0,001	0,035	0,02
pH	7.8	7.5	7.7	8,1
ASTT (mOsm.kg ⁻¹)	342	335	327	320

RSW: Ringer's solution for seawater fish species; RFW: Ringer's solution for freshwater fish species; MHer: Modified of Her; ASP: artificial seminal plasma.

Nghiên cứu xác định tỷ lệ pha loãng tốt nhất cho bảo quản lạnh tinh trùng cá chêm mồm nhọn

Từ kết quả thí nghiệm 1, chọn một chất bảo quản (tương ứng tỷ lệ pha loãng) tốt nhất, để xác định tỷ lệ pha loãng bảo quản với các thang nhiệt độ 0, 2 và 4°C.

Để xác định tỷ lệ pha loãng tối ưu, ta tiến hành pha loãng tinh dịch với các tỷ lệ 1:1, 1:3, 1:5 và 1:10 (trong chất bảo quản tốt nhất) và bảo quản trong tủ lạnh ở 0, 2 và 4°C. Hoạt lực của tinh trùng được tiến hành đánh giá như trên.

Nghiên cứu xác định mức nhiệt độ tốt nhất với các thang nhiệt độ 0, 2 và 4°C

Từ kết quả thí nghiệm 2, chọn một chất bảo quản (tương ứng tỷ lệ pha loãng) tốt nhất, để xác định thang nhiệt độ lưu trữ lạnh tinh trùng.

Để xác định nhiệt độ tối ưu, ta tiến hành pha loãng tinh dịch với tỷ lệ tốt nhất trong chất bảo quản tốt nhất và bảo quản trong tủ lạnh ở 0, 2 và 4°C. Hoạt lực của tinh trùng được tiến hành đánh giá như trên.

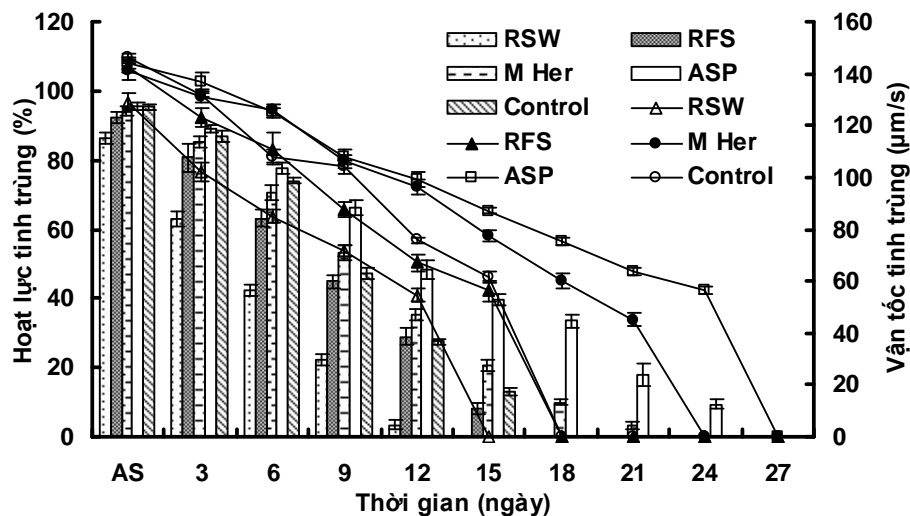
Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được trình bày dưới dạng giá trị trung bình \pm sai số chuẩn. Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel. Tác động của chất bảo quản, tỷ lệ pha loãng và kháng sinh đến hoạt lực của tinh trùng được phân tích phương sai một yếu tố (One-way ANOVA) bằng phần mềm SPSS 16.0.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định chất bảo quản tốt nhất cho chất bảo quản tinh trùng cá trong tủ lạnh

Hoạt lực của tinh trùng cá chêm mớm nhon bảo quản trong RSW, M Her, RFS, ASP được thể hiện thông qua Hình 1.

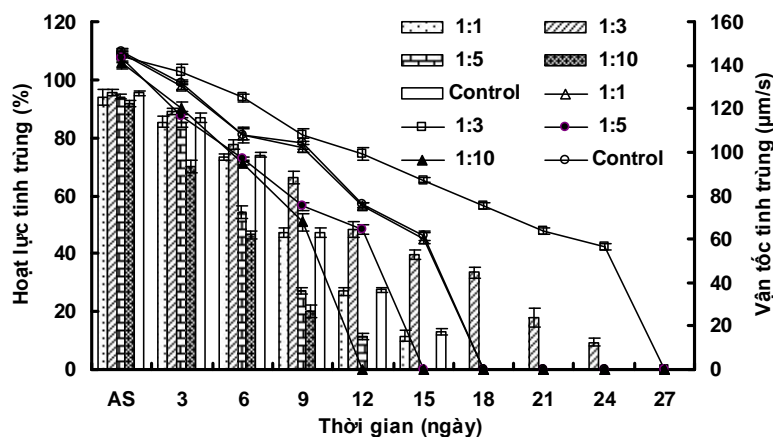


Hình 1. Hoạt lực (%) và vận tốc ($\mu\text{m.giây}^{-1}$) của tinh trùng cá chêm mớm nhon bảo quản trong RSW, MHer, RFS, ASP trong tủ lạnh. Control: không pha loãng
 Tinh trùng được bảo quản trong ASP duy trì khả năng sống lâu nhất đến ngày 24 với hoạt lực là 9,44% và vận tốc đạt $56,44 \mu\text{m.giây}^{-1}$, thấp nhất khi bảo quản trong RSW với hoạt lực và vận tốc lần lượt là 3,33%, $54,56 \mu\text{m.giây}^{-1}$ và sống đến 12 ngày. Qua Hình 1 phân tích ta thấy hoạt lực của tinh trùng có sự sai khác không đáng kể giữa các chất bảo quản sau ngày thứ nhất; cụ thể: bảo quản trong ASP, MHer và RFS hoạt lực tinh trùng không có sự sai khác nhưng lại sai khác về vận tốc so với lô tinh trùng bảo quản trong RSW và nhóm này sai khác so với lô đối chứng ($P < 0,05$). Đến ngày thứ 6 thì đã có sự sai khác hoàn toàn giữa 5 chất bảo quản và so với lô đối chứng.

Muchlisin (2005) cho rằng chất bảo quản là môi trường đệm giúp pha loãng tinh dịch và để có được lượng tinh trùng pha loãng lớn trong sinh sản nhân tạo. Do đó, việc sử dụng chất bảo quản trong quá trình bảo quản lạnh tinh trùng là rất cần thiết. Việc lựa chọn chất bảo quản thích hợp rất quan trọng, thành phần của chất bảo quản dựa trên thành phần có trong tinh dịch cá. Đối với tinh trùng của cá đù vàng (*Larimichthys polyactis*) khi bảo quản trong ASP (Dịch tương nhân tạo: Artificial Seminal Plasma) có thể sống được 14 ngày và trong marine fish Ringer's solution được 10 ngày (Le và ctv., 2011). Như vậy, ở các loài cá khác nhau thì chất bảo quản cũng khác nhau.

Nghiên cứu xác định tỷ lệ pha loãng tốt nhất cho bảo quản lạnh tinh cá

Hoạt lực của tinh trùng cá chêm mỗm nhọn bảo quản trong ASP khi ở các tỷ lệ pha loãng 1:1, 1:3, 1:5 và 1:10 được thể hiện thông qua Hình 2.



Hình 2. Hoạt lực (%) và vận tốc ($\mu\text{m.giây}^{-1}$) của tinh trùng với các tỷ lệ pha loãng khác nhau trong ASP bảo quản trong tủ lạnh. Control: không pha loãng.

Qua Hình 2 ta thấy tinh trùng bảo quản ở tỷ lệ 1:3 cho hoạt lực tốt nhất 9,44%, vận tốc 56,44 $\mu\text{m.giây}^{-1}$ kéo dài thời gian sống đến 24 ngày và ngắn nhất là ở tỷ lệ 1:10 hoạt lực 20%, với vận tốc 67,78 $\mu\text{m.giây}^{-1}$ chỉ có thể sống được 9 ngày. Sau 3 ngày bảo quản hoạt lực, vận tốc của tinh trùng bảo quản ở các tỷ lệ đều có sự sai khác hoàn toàn với nhau và so với lô đối chứng ($P < 0,05$).

Theo nghiên cứu của Le và *ctv.* (2011), thì tinh trùng cá đù vàng (*Larimichthys polyactis*) bảo quản ở tỷ lệ 1:3 cho thời gian sống lâu nhất (14 ngày), trong khi đó ở tỷ lệ 1:1 (10 ngày) và tỷ lệ 1:5 (12 ngày). Đối với tinh trùng cá tuyết Đại Tây Dương (*Gadus morhua*), cá tuyết chấm đen (*Melanogrammus aeglefinus*) và cá mướp vân (*Osmerus mordax*) tỷ lệ pha loãng 1:3 tốt hơn so với các tỷ lệ 1:1, 1:2, 1:5 và 1:10 (DeGraaf và *ctv.*, 2004). Ở tinh trùng cá trê Phi (*Clarias gariepinus*) tỷ lệ 1:5 thì tốt hơn so với tỷ lệ 1:3 hay 1:10 (Erdahl và *ctv.*, 1987). Như vậy, từng loài cá khác nhau thì bảo quản ở các tỷ lệ khác nhau.

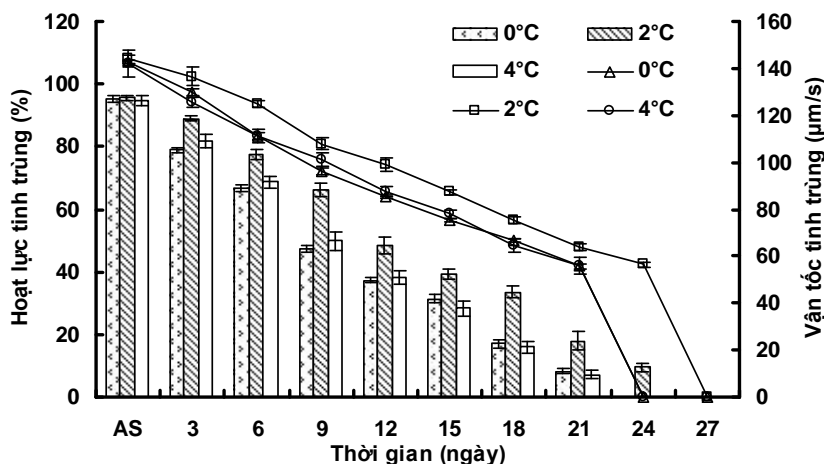
Nghiên cứu xác định thang nhiệt độ tốt nhất với các thang nhiệt độ 0, 2 và 4°C

Hoạt lực của tinh trùng cá chêm mỗm nhọn bảo quản trong ASP khi với tỷ lệ pha loãng 1:3 ở các thang nhiệt độ 0, 2 và 4°C được thể hiện thông qua Hình 3.

Hình 3 cho thấy tinh trùng bảo quản ở thang nhiệt độ 2°C cho hoạt lực và vận tốc của tinh trùng tốt nhất (9,44% và 56,44 $\mu\text{m.giây}^{-1}$), thời gian sống kéo dài đến 24 ngày và ngắn nhất là ở nhiệt độ 0 và 4°C với cùng vận tốc 55,89 $\mu\text{m.giây}^{-1}$ và hoạt lực lần lượt 8,11%, 7,22%, chỉ sống đến 21 ngày. Ta thấy sau 1 ngày bảo quản hoạt lực của tinh trùng trong ASP với tỷ lệ 1:3 ở các thang nhiệt độ trên không có sự sai khác. Đến ngày thứ 3 thì hoạt lực của tinh trùng trong ASP với tỷ lệ 1:3 ở các thang nhiệt độ khác nhau có sự sai khác hoàn toàn với nhau.

Nhiệt độ thường được sử dụng để bảo quản tinh trùng từ 0-4°C vì nhiệt độ thấp làm giảm khả năng sinh trưởng của vi khuẩn (Bobe và *ctv.*, 2009). Tinh trùng cá hồi có thể sống vài ngày ở nhiệt độ 1-4°C (Basavaraja và *ctv.*, 2005), ở 0°C tinh trùng cá bơn (*Paralichthys olivaceus*) duy trì khả năng hoạt lực lên đến 30 ngày (Lim và *ctv.*, 2006) trong khi đó hoạt lực tinh trùng cá bơn sao (*Platichthys stellatus*) bảo quản ở 4°C là 16 ngày (Lim và *ctv.*, 2006). Theo Le và *ctv.* (2011) tinh trùng cá đù vàng (*Larimichthys polyactis*) bảo quản ở 0°C duy trì thời gian hoạt

lực 14 ngày. Qua đó ta thấy mỗi loài cá khác nhau thích hợp với các thang nhiệt độ bảo quản khác nhau.



Hình 3. Hoạt lực (%) và vận tốc ($\mu\text{m}.\text{giây}^{-1}$) của tinh trùng với tỷ lệ pha loãng 1:3 bảo quản ở các thang nhiệt độ 0, 2 và 4°C trong ASP

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT Ý KIẾN

Kết luận

Tinh trùng được bảo quản trong ASP cho thời gian hoạt lực và vận tốc tốt nhất duy trì đến ngày thứ 24 và ngắn nhất khi bảo quản trong RSW chỉ duy trì đến ngày thứ 12.

Thời gian hoạt lực và vận tốc của tinh trùng duy trì lâu nhất khi bảo quản trong ASP ở tỷ lệ pha loãng 1:3 lên đến 24 ngày và ngắn nhất ở tỷ lệ 1:10 chỉ sống đến ngày thứ 9.

Tinh trùng được pha loãng ở tỷ lệ 1:3 trong ASP và bảo quản ở 2°C cho thời gian hoạt lực và vận tốc cao nhất, kéo dài đến ngày 24 và thấp nhất ở 0°C và 4°C chỉ sống đến ngày 21.

Đề xuất ý kiến

Qua các thí nghiệm cho thấy tỷ lệ sống và thời gian hoạt lực của tinh trùng cá chêm mồm nhọn thay đổi theo thời gian bảo quản, ở đó chất lượng tinh trùng cũng thay đổi. Do đó, đối với các nghiên cứu sau này nên tiến hành cho thụ tinh nhằm đánh giá được chất lượng tinh trùng một cách chính xác hơn.

Nghiên cứu này chưa đánh giá tác động của kháng sinh lên thời gian bảo quản tinh trùng trong tủ lạnh. Chính vì thế, các nghiên cứu sau nên tiến hành thí nghiệm để đánh giá vai trò của kháng sinh lên thời gian bảo quản tinh trùng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt

Đàm Bá Long, 2005. Luận văn thạc sĩ "Nghiên cứu bảo quản tinh trùng cá mè trắng (*Hypophthalmichthys molitrix*) trong Nitơ lỏng (-196°C)". Trường Đại học Nha Trang.

Nguyễn Trọng Nho, Lục Minh Diệp, Nguyễn Địch Thanh và Châu Văn Thanh, 2003. Nghiên cứu sản xuất giống nhân tạo cá Chêm mồm nhọn (*Psammoperca waigiensis* Cuvier & Valenciennes, 1828). Hợp đồng nghiên cứu phát triển công nghệ giữa trường Đại học Nha Trang và Ban Quản lý Hợp Phần SUMA, Bộ Thủy Sản.

Vũ Văn Toàn, 2002. Danh Mục Các Loài Nuôi Biển Và Nuôi Nước Lợ Việt Nam. Hợp Phần Hỗ Trợ Nuôi Trồng Thủy Sản Biển Và Nước Lợ (SUMA), Danida- Bộ Thủy Sản, Hà Nội 2002: p. 118.

Tài liệu tiếng Anh

- Basavaraja, N. and S.N. Hegde, 2005. Some characteristics and short-term preservation of spermatozoa of Deccan mahseer *Tor khudree*. *Aquacult. Res.*, **36**: p. 422-430.
- Bobé, J. and C. Labbe, 2009. Chilled storage of sperm and eggs, in *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species*, Cabrita, E., Robles, V. and Herráez, P., Editors. CRC Press, Taylor Francis Group. p. 219-235.
- Christensen, J.M and T.R.Tiersch, 1996. Refrigerated storage of channel catfish sperm. *J World Aquacult Soc*, **27**: p. p. 340.
- DeGraaf, J.D. and D.L. Berlinsky, 2004. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. *Aquaculture*, **234**: p. 527.
- Erdahl, A.W., J.G.Cloud, and E.F. Graham, 1987. Fertility of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gametes: Gamete viability in artificial media. *Aquaculture*, **60**: p. 323.
- Le, M.H., H.K. Lim, B.H. Min, M.S. Park, and Y.J. Chang, 2011. Storage of Yellow Croaker *Larimichthys polyactis* Semen. *The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh*.
- Lim, H.K., C.M. An, M.H. Son, M.W. Park, E.O. Kim S.G. and Byun, 2006. Effect of diluents and temperature on sperm storage in starry flounder *Platichthys stellatus*. *J. Aquacult.*, **19**: p. 47-51.
- Lim, H.K., C.M. An, M.H. Son, M.W. Park Y.J. and Park, 2005. Effect of diluents for cold storage of olive flounder *Paralichthys olivaceus* sperm. *J. Kor. Fish. Soc.*, **38**: p. 232-238.
- Muchlisin, Z.A., 2005. Review: Current Status of Extenders and Cryoprotectants on Fish Spermatozoa Cryopreservation. *BIODIVERSITAS*, **6**: p. 1.
- Park, C. and F.A. Chapman, 2005. An Extender Solution for the Short-Term Storage of Sturgeon Semen. *N Am J Aquacult*, **67**: p. p. 52.
- Stoss, J. and W. Holtz, 1983. Successful storage of chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) spermatozoa for up to 34 days. *Aquaculture*, **31**: p. p. 269.