



DOI:10.22144/ctu.jvn.2022.196

## CRYOBANK: GIẢI PHÁP KHÔI PHỤC NHANH ĐÀN VẬT NUÔI SAU DỊCH BỆNH

Trần Thị Thanh Khương<sup>1\*</sup>, Lâm Phước Thành<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Kim Khang<sup>2</sup>, Nguyễn Trọng Ngử<sup>2</sup> và Dương Nguyễn Duy Tuyền<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ Sinh học và Thực phẩm, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Bộ môn Chăn nuôi, Trường Nông nghiệp, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>3</sup>Đơn vị IVF hỗ trợ sinh sản, Bệnh viện Mỹ Đức

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thị Thanh Khương (email: tttkhuong@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 12/09/2022

Ngày nhận bài sửa: 30/09/2022

Ngày duyệt đăng: 17/10/2022

### Title:

Cryobank: rapid re-herding solutions for livestock after disease

### Từ khóa:

Cấy truyền phôi, con giống, cryobank, gieo tinh nhân tạo, tái đàn

### Keywords:

Artificial insemination, breedings, cryobank, embryo transfer, re-herding

### ABSTRACT

Cryobank or cryoconservation of animal genetic resources is the collection and deep-freezing of mammalian cells. One of the important steps in the cryobank process is that the cell is isolated from animals that have been screened for free of pathogens before kept at  $-196^{\circ}\text{C}$ . Cryobank is considered one of the important solutions in the recovery of livestock herds after the epidemic, which is the rapid supply of breedings negative for pathogens. Vietnam's livestock production is currently facing epidemics in livestock and poultry. Consequently, there is an urgent demand for high-yield, disease-free breedings. Cryobank along with techniques of reproductive biotechnology has been used for a very long period and frequently in industrialized countries to mass create disease-free animal breeds with valuable genetic resources and speedy responses to the market. This overview will analyze the difficulties faced by Vietnam's livestock business due to epidemics, introduce methods used globally by cryobank and reproductive biotechnologies to provide disease-free breedings, and provide comprehensive details on cryobanks for animal semen.

### TÓM TẮT

Cryobank hay cryoconservation of animal genetic resource là ngân hàng lưu trữ tế bào động vật trong điều kiện đông lạnh. Một trong những bước quan trọng trong quy trình của cryobank là nguồn tế bào được thu nhận từ vật nuôi đã được sàng lọc các mầm bệnh trước lưu trữ ở nhiệt độ  $-196^{\circ}\text{C}$ . Chăn nuôi Việt Nam hiện đang đối mặt với các dịch bệnh trên đàn gia súc gia cầm nên nhu cầu về con giống sạch bệnh, có năng suất cao trở nên rất cấp thiết. Cryobank cùng với kỹ thuật công nghệ sinh học sinh sản sản xuất hàng loạt con giống sạch bệnh, đáp ứng nhanh cho thị trường đã được áp dụng rộng rãi ở các nước phát triển. Bài viết tập trung phân tích những thách thức từ dịch bệnh của ngành chăn nuôi, tổng hợp những phương pháp sản xuất con giống sạch bệnh từ cryobank và công nghệ sinh học sinh sản trên thế giới và cung cấp những quy trình cơ bản trong đông lạnh tinh trùng động vật nuôi.

### 1. THÁCH THỨC TỪ DỊCH BỆNH CỦA NGÀNH CHĂN NUÔI

Theo báo cáo của Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn (NN và PTNN), năm 2021, nhiều dịch bệnh trên gia súc, gia cầm đã gây thiệt hại hàng tỷ đồng cho ngành chăn nuôi. Dự báo trong năm 2022, rủi ro dịch bệnh trên vật nuôi vẫn còn rất lớn. Cụ thể, từ đầu năm đến tháng 2/2022 nay, cả nước có tổng số 13,6 ngàn gia cầm bệnh chết và tiêu hủy do cúm A/H5N1, A/H5N6 và A/H5N8, có hơn 168 ổ dịch tả heo châu Phi chưa qua 21 ngày, hơn 19,6 ngàn con heo mắc bệnh đã tiêu hủy, viêm da nổi cục trên trâu bò xảy ra tại 17 xã thuộc 2 tỉnh thành trên cả nước (Nguyễn, 2022). Trải qua năm 2021 đầy biến động với ngành nông nghiệp nói chung và ngành y chăn nuôi nói riêng, năm 2022 sẽ là một năm với nhiều khó khăn hơn nữa: như dịch bệnh trên người, dịch bệnh trên vật nuôi và đứt gãy các chuỗi cung ứng toàn cầu, tình hình chăn nuôi trong nước chưa có những động thái tích cực và những khó khăn, thách thức vẫn còn rất lớn (Dương, 2022).

Để khắc phục tình trạng trên và nhằm từng bước giảm thiểu những khó khăn của ngành chăn nuôi, Thủ tướng Chính phủ đã phê duyệt tại Quyết định số 1520/2020/QĐ-TTg, ngày 6 tháng 10 năm 2020 về Chiến lược phát triển chăn nuôi 2021-2030, tầm

nhìn 2045. Trong đó, hướng dẫn cụ thể các giải pháp một cách đồng bộ giữa các ban ngành với mục tiêu phát triển ngành chăn nuôi bền vững. Một trong những đề án được đưa lên đầu tiên ở Quyết định này là “nghiên cứu những công nghệ sản xuất vật nuôi”. Ở điều kiện bình thường, giống vật nuôi có năng suất cao, thích nghi với biến đổi khí hậu rất quan trọng, và trong điều kiện dịch bệnh phức tạp, cùng với nhu cầu tái đàn nhanh sau dịch bệnh, thì nhu cầu con giống vật nuôi sạch bệnh lại càng cấp thiết hơn. Để tái đàn hiệu quả, Bộ NN và PTNN khuyến cáo người dân cần thận trọng và tuân thủ những quy định về phòng chống dịch và chăn nuôi theo hướng an toàn sinh học. Tuy nhiên, tỉ lệ tái đàn và tăng đàn ở một số địa phương còn thấp hơn so với dự kiến. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến chương trình này là: đứt quản chuỗi cung ứng, biến động của thị trường khiến giá thành thức ăn và thuốc thú y tăng cao, các hộ chăn nuôi nhỏ thiếu vốn tái đàn, cơ sở vật chất không đảm bảo tiêu chuẩn chăn nuôi an toàn và tình trạng con giống vật nuôi khan hiếm. Với con giống vật nuôi, đây là một trong những khó khăn cơ bản của các hộ và trang trại khi tái đàn. Theo khảo sát, khoản một nửa số hộ chăn nuôi báo cáo về tình hình mua con giống với giá cao, chất lượng không ổn định và điều kiện giống không đảm bảo nguồn gốc, kiểm định dịch bệnh (Quang, 2020; Chánh & Vũ, 2022).

**Bảng 1. Các tác nhân gây bệnh (virus gây dịch tả heo Châu Phi, virus gây lở mồm long móng,...) và khả năng lây truyền qua đường sinh dục trong giao phối tự nhiên hoặc gieo tinh bằng tinh dịch tươi**

Tác nhân gây bệnh	Phân lập virus trong tinh dịch	Nguy cơ lây nhiễm
Porcine adenovirus (pADV 1-5, pADV AC, virus gây bệnh đường tiêu hóa nhẹ ở heo)	cao	thấp
African swine fever virus (ASFV, virus gây bệnh dịch tả heo châu Phi)	cao	cao
Blue eye disease virus (virus gây bệnh mắt xanh)	cao	cao
Porcine sapelovirus (PSV, sapelovirus ở heo)	cao	cao
Classical Swine Fever Virus (CSFV, virus gây bệnh sốt heo cổ điển)	cao	cao
Foot-and-mouth disease virus (FMDV, virus gây lở mồm long móng)	cao	thấp
Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI, virus cúm)	cao	thấp
Porcine Circovirus Type 2 (PCV2, circovirus loại II ở heo)	cao	cao
Porcine parvovirus (PPV, virus gây suy sinh sản ở heo)	cao	cao
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV, Virus hội chứng hô hấp và sinh sản ở heo)	cao	cao
Retrovirus	cao	thấp
Swine vesicular disease (SVD, virus bệnh mụn nước ở heo)	cao	cao
Transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV, virus viêm dạ dày ruột nguyên nhiễm)	cao	rất thấp

(Nguồn: Martins Pereira et al., 2013)

Hiện nay, ở vùng đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), việc sản xuất con giống trên gia cầm và

một số gia súc như trâu, dê, cừu hầu hết là kết quả của giao phối tự nhiên. Khi dịch bệnh xảy ra, cả con

đực giống và con cái giống đều mang mầm bệnh, vì thế trang trại và nông hộ không có khả năng tự cung cấp con giống (Dhama et al., 2014). Ngay cả trên chăn nuôi heo, mặc dù heo được áp dụng phương pháp gieo tinh nhân tạo (GTNT) bằng tinh tươi, nhưng nguồn tinh tươi được khai thác ngay tại chỗ và phải sử dụng trong thời gian ngắn (tối đa 7 ngày). Vì vậy, nếu con đực giống mang mầm bệnh như virus gây dịch tả heo Châu Phi, virus lở mồm long móng thì tinh tươi được khai thác sau đó đều có khả năng cao lây truyền mầm bệnh qua đường GTNT (Bảng 1). Đây là một trong những nguyên nhân làm giảm số lượng con giống và khiến nguồn cung cấp con giống cho tái đàn khan hiếm.

## 2. SẢN XUẤT CON GIỐNG SẠCH BỆNH BẰNG CRYOBANK VÀ CÁC KỸ THUẬT CÔNG NGHỆ SINH HỌC SINH SẢN

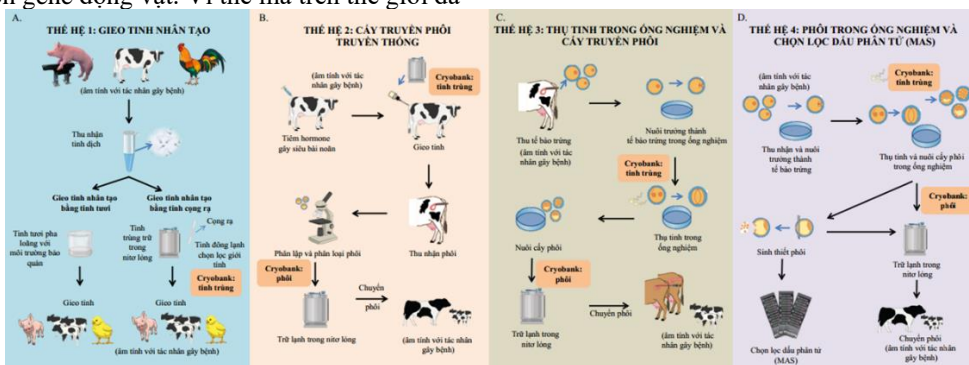
Cryobank hay cryoconservation of animal genetic resource là ngân hàng lưu trữ tế bào động vật như tế bào tinh trùng, tế bào trứng, phôi và tế bào sinh dưỡng trong điều kiện đông lạnh (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2007, Groeneveld et al., 2016)). Một trong những bước quan trọng trong quy trình của cryobank là nguồn tế bào được thu nhận từ vật nuôi đã được chọn lọc, lai tạo *in vitro* và sàng lọc các mầm bệnh trước khi áp dụng các công nghệ làm lạnh và lưu trữ ở nhiệt độ -196°C trong thời gian lên đến hàng chục năm. Chính vì khả năng lưu trữ lâu dài như vậy, mà cryobank hay bảo quản lạnh là một trong những công cụ hữu ích không những trong sản xuất những con giống sạch bệnh mà còn để cải thiện chọn lọc, cải biến di truyền và bảo tồn nguồn gen. Chính vì tầm quan trọng của việc bảo quản lạnh mà trong kế hoạch toàn cầu của mình, FAO (2007, 2012) đã kiến nghị thực hiện các chương trình bảo tồn nguồn gene động vật. Vì thế mà trên thế giới đã

có rất nhiều ngân hàng gene đông lạnh ra đời như ở nhiều nước Châu Âu, Châu Phi ( Leroy et al., 2019; Iaffaldano et al., 2021; Tomka et al., 2022), Mỹ (Blackburn, 2009).

Để sản xuất con giống, cryobank phải kết hợp với những kỹ thuật công nghệ sinh học trong sinh sản. Ngành công nghệ sinh học sinh sản được đánh dấu bằng việc gieo tinh nhân tạo bằng tinh trùng đông lạnh trong cọng rạ được thực hiện đầu tiên vào năm 1953. Nhóm nghiên cứu của Sherman et al. (1953) đã chứng minh rằng tinh trùng đông lạnh bằng glycerol khi rã đông, có thể thụ tinh với tế bào trứng và phôi hình thành phát triển bình thường. Đây là trường hợp mang thai đầu tiên sử dụng tinh đông lạnh trên người thành công được báo cáo vào năm 1953 (Bunge & Sherman, 1953).

Trên gia súc, những lợi thế khiến cryobank tinh trùng có vai trò quan trọng như: (1) duy trì đa dạng di truyền ở động vật nuôi cũng như động vật hoang dã (Critser & Russell, 2000; Woelders et al., 2012); (2) tạo thuận lợi lai tạo xa giữa các vùng trong nước và thế giới trên những giống có đặc tính vượt trội về mặt di truyền (Barbas & Mascarenhas, 2009); (3) bảo tồn và khôi phục động vật có nguy cơ tuyệt chủng (Walters et al., 2009); (4) sử dụng ngân hàng gene động vật biến đổi gene làm mô hình bệnh ở người (Agca, 2012). Chính vì vậy, kỹ thuật này đã được áp dụng lần đầu tiên trên bò (Bratton et al., 1955), heo (Bwanga et al., 1990), gia cầm (Shaffner et al., 1941) và các động vật nuôi khác (Walters et al., 2009), và ngày càng được phát triển đến hôm nay.

Về phương pháp tạo ra con giống bằng cryobank và các kỹ thuật công nghệ sinh học sinh sản được tóm tắt ở Hình 1.



**Hình 1. Sơ đồ mô tả các thể hệ ứng dụng cryobank và công nghệ sinh học sinh sản trong sản xuất con giống vật nuôi**

Thế hệ thứ 1 (A): Tinh trùng được chọn lọc và âm tính với tác nhân gây bệnh (Morrell, 2011). Quá

trình gieo tinh nhân tạo trên con cái động dục tự nhiên hoặc nhân tạo bằng tinh tươi hoặc tinh cọng

ra (cryobank tinh trùng) là công cụ chính trong các chương trình cải thiện giống bò sữa/thịt, dê, cừu, heo, gia cầm,... ở các nước phát triển. Kỹ thuật này chủ yếu gia tăng tối đa khả năng khai thác tiềm năng di truyền tốt của con đực giống. Đực giống được chọn lọc cẩn thận với những ưu thế di truyền và âm tính với tác nhân gây bệnh. Tinh dịch được thu nhận, đánh giá, pha loãng và bảo quản dưới dạng tinh tươi hoặc tinh đông lạnh. Từ 1 lần xuất tinh của đực giống có thể sử dụng phối giống cho hàng chục con cái khác nhau. Ngoài ra, tinh đông lạnh sẽ giúp cho việc phân phối nguồn chất liệu di truyền tốt đến khắp nơi trên thế giới. Ước tính, hàng năm trên toàn thế giới khoảng 100 triệu lần GTNT trên bò, 40 triệu trên heo, 3,3 triệu trên cừu và 500 000 trên dê. Tuy nhiên hạn chế của kỹ thuật này là chi phí vận dụng được ½ kiểu gene tốt từ con đực (Thibier & Wagner, 2002; Wiebke et al., 2021).

Thế hệ thứ 2 (B): Kỹ thuật này cơ bản dựa trên kỹ thuật gây siêu bài noãn và động dục đồng loạt, từ đó gia tăng khả năng khai thác tiềm năng di truyền tốt của con cái giống. Đồng thời, việc bảo tồn đông lạnh trứng và phối cũng giúp cho phân phối chất di truyền tốt được thuận lợi và rộng khắp hơn, cũng như giúp bảo tồn những nguồn gene quý. Ước tính, có khoảng 440.000 phối trên bò, 17.000 phối trên cừu, 2.500 phối trên ngựa và 12.000 phối trên đực cây truyền trên dê hàng năm. Ngoài ra, khoảng 80% bò đực giống trên khắp thế giới được sinh ra từ cây truyền phối (ET) (Squires et al., 1999, Perry, 2014, Thibier, M. 2009).

Thế hệ thứ 3 (C): Với phương pháp này, tế bào noãn được thu nhận trực tiếp từ những con cái giống đã được tuyển chọn, sau đó những tế bào này sẽ được nuôi trưởng thành trong phòng thí nghiệm. Phôi được tạo ra trong phòng thí nghiệm là sự kết hợp giữa tế bào noãn và tế bào tinh trùng từ nguồn đông lạnh được đã được tuyển chọn. Phương pháp này tạo được nhiều phôi hơn ở thế hệ thứ 2, yêu cầu ít số lượng tinh trùng hơn và đồng thời có thể xác định được giới tính của phôi trước khi cấy truyền. Tuy nhiên, trong việc này không thể thực hiện nếu phôi được tạo ra từ những phương pháp ở thế hệ thứ 2 (Wagtendonk-de Leeuw, 2006; Obuchi et al., 2019).

Thế hệ thứ 4 (D): Kỹ thuật chọn lọc phôi trong phòng thí nghiệm trước khi cấy truyền phôi. Các tế bào phôi sẽ được thu nhận bằng phương pháp sinh thiết và được chọn lọc với sự hỗ trợ của các gene marker (marker assisted selection\_MAS) (Ponsart et al., 2014; de Sousa et al., 2017). Một trong những MAS ứng dụng phổ biến trên bò là microarray chip

the Bovine SNP50. The BovineSNP50 chứa gần 54.000 dấu phân tử đa hình đơn nucleotide (single nucleotide polymorphism) dọc theo bộ gene của bò (Matukumalli et al., 2009). Gần đây, nhờ vào sự phát triển vượt trội của công nghệ giải trình gene thế hệ mới, và phương pháp nghiên cứu liên kết toàn hệ gene (Genome Wide Association Study), nhiều microarray đã được phát triển và sử dụng với mục đích chọn lọc gene marker: như GeneSeek GGP-LDv3, GeneSeek GGP-LDv4, GeneSeek GGP-90KT, GeneSeek GGP-HDv3, GeneSeek Bovine-GGP-F250, and Illumina HD 778K (Crum et al., 2019; Smith et al., 2022). Bằng việc chọn lọc con giống bằng kiểu gene đã mang lại nhiều giá trị như tăng tính chính xác của chọn lọc thông qua các thông tin liên quan trực tiếp đến kiểu gene, đồng thời rút ngắn thời gian chọn giống so với lai tạo thông thường.

Theo báo cáo của Hiệp hội Công nghệ Phôi Quốc tế (IETS) về dữ liệu các hoạt động chuyên phối (ET) trên toàn cầu vào năm 2020, sản xuất phôi trên thế giới tăng lên trong hầu hết các vùng và tất cả các loài, bất chấp đại dịch Covid-19 và ảnh hưởng tiêu cực đến nền kinh tế toàn cầu (Viana, 2020). Số liệu thống kê của ngành công nghiệp phối của bò, cừu, dê và ngựa trên thế giới vào năm 2020 được mô tả cụ thể Bảng 2. Lần đầu tiên, hơn 1,5 triệu phôi bò đã được ghi nhận, tăng 7,0% so với năm 2019 (1.518.150 so với 1.419.336; tương ứng). Trên toàn thế giới, phôi IVP (phôi bò được sản xuất ở thế hệ thứ 3, Hình 1C) chiếm 76,2% tổng số phôi gia súc có thể chuyên giao trong năm 2020. Thị trường sản xuất và xuất khẩu các phôi ở các loài động vật khác cũng diễn ra sôi nổi. Số lượng IVD (phôi bò được sản xuất ở thế hệ thứ 2, Hình 1B) phôi tăng ở ngựa (+ 13,6%), cừu (+ 33,3%) và dê (+ 51,0%); và phôi IVP cũng tăng ở ngựa (+ 37,1%) và dê (+ 204,1%) so với năm 2019. Ở tất cả các loài này (ngựa, cừu và dê) tổng số phôi được ghi nhận cao nhất vào năm 2020. Đồng thời, theo số liệu của những nước có gửi báo cáo, thì hơn 31,7% các quốc gia trên thế giới có sản xuất và trao đổi phôi vật nuôi. Đây là minh chứng về việc sản xuất con giống bằng công nghệ cấy truyền phôi đã được ứng dụng mạnh mẽ ngày một nhiều trên thế giới. Như vậy, cryobank tinh trùng, phôi không những sản xuất những con giống sạch bệnh mà còn tạo ra những con giống mang những đặc điểm di truyền ưu thế, có khả năng vận chuyển trong nước và xuất khẩu đi các vùng lãnh thổ, vấn đề mà giao phối tự nhiên không thể làm được.

**Bảng 2. Số liệu về thị trường trao đổi phôi giống động vật của bò, ngựa, cừu và dê giữa các vùng lãnh thổ trên thế giới**

Vùng lãnh thổ	Bò		Ngựa		Cừu		Dê	
	IVD	IVP	IVD	IVP	IVD	IVP	IVD	IVP
Châu Phi	2.763	4.977	0	0	0	0	0	0
Châu Á	0	0	0	0	0	0	0	0
Châu Âu	126.491	47.470	2.248	5.359	966	0	346	0
Bắc Mỹ	196.704	578.995	851	1.126	9.204	141	10.757	2,275
Châu Đại Dương	4.211	14.345	0	0	12.427	0	1.890	0
Nam Mỹ	31.559	500.397	22.120	2.156	7.222	0	184	0
Tổng 2020	361.728	1.156.422	15.219	8.641	29.819	141	13.177	2.275
Tổng 2019	387.769	1.031.567	22.198	6.303	22.374	1.137	8.725	748
So với 2020 (%)	-6,7	+12,1	+13,6	+37,1	+33,3	-87,6	+51,0	+204,1

IVD: phôi được sản xuất ở thể hệ thứ 2 (Hình 1B), IVP: phôi được sản xuất ở thể hệ thứ 3 (Hình 1C). (Nguồn: Viana, 2019)

**3. CRYOBANK: NHỮNG QUY TRÌNH CƠ BẢN TRONG ĐÔNG LẠNH TINH TRÙNG ĐỘNG VẬT**

Cryobank các loại động vật như tế bào tinh trùng, tế bào trứng, phôi và tế bào sinh dưỡng trong điều kiện đông lạnh. Trong các loại tế bào trên, cryobank trên tinh trùng là loại tế bào được nghiên cứu và ứng dụng đầu tiên và cũng như quan trọng cho các lĩnh vực ứng dụng công nghệ sinh học sinh sản trong phát triển con giống. Vì thế, bài viết sẽ tập trung mô tả chi tiết quy trình trong cryobank tinh trùng.

*Đông vật thí nghiệm:* Trước khi tiến hành lấy tinh trùng, bước chọn lọc đực giống là một trong những bước chính yếu. Con đực giống phải là những con đực mang những ưu thế về kiểu hình và kiểu gene mang tính trạng về kinh tế như năng suất, tăng trọng, chống chịu điều kiện khí hậu, hiệu quả hấp thụ thức ăn... đang ở độ tuổi sinh sản và đều qua các bước kiểm nghiệm âm tính với các tác nhân gây bệnh như *Salmonella*, *Gallinarum Pullorum*, *Salmonella enteritidis*, *Typhimurim*, *Mycoplasma* trên gia cầm (Blesbois et al., 2007; Dhama et al., 2014); African Swine Fever (ASF) và Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (HP-PRRS) ở heo (Chanapiwat et al., 2020); virus gây viêm da nổi cục ở trâu bò (Annandale et al., 2018), lở mồm long móng và các bệnh khác ở gia súc (Givens, 2018).

*Phương pháp lấy tinh:* Tinh dịch là một trong những nguồn gengine động vật và có thể thu nhận bằng các phương pháp sau:

*Massage trên gia cầm:* Thu nhận tinh dịch trên gia cầm là một trong những phương pháp đơn giản và không xâm lấn, được phát triển từ năm 1973

(Burrows & Quinn, 1937) và được sử dụng rộng rãi đến bây giờ (Iaffaldano et al., 2021). Nguyên lý cơ bản của phương pháp này là giữ cố định con trống và nhẹ nhàng massage phần dưới bụng của con trống. Con trống đáp ứng lại bằng cách cương dương và lúc này người thu nhận nhẹ nhàng bóp dương vật và thu nhận tinh dịch vào ống đựng mẫu. Để khai thác tối đa và dễ dàng tinh dịch gia cầm, con trống và con mái cần được nhốt riêng và xen kẽ nhau. Đồng thời con trống không nên được cho ăn ít nhất 12 giờ trước khi thu mẫu để hạn chế sự ô nhiễm của phân trong tinh dịch.

Phương pháp lấy tinh bằng tay: Phương pháp khai thác tinh dịch heo bằng tay đã được thực hiện đầu tiên vào năm và ứng dụng rộng rãi ở các cơ sở sản xuất tinh đực heo giống. Chất lượng của khai thác tinh sẽ phụ thuộc nhiều vào tay nghề (kỹ thuật của kỹ thuật viên). Heo đực giống trước khi khai thác thu nhận tinh dịch cần được huấn luyện đực nhảy giá. Tùy theo mỗi giống heo và kỹ thuật viên, thời gian thông thường cho heo thành thạo là từ 2- 4 tuần. Phương pháp khai thác này không cần nhiều về các thiết bị. Kỹ thuật viên sẽ dùng tay đeo găng tay chuyên dụng để thực hiện, các dụng cụ lấy tinh như cốc thủy tinh, gạc lọc tinh, găng tay và lọ đựng tinh phải được khử trùng và làm ấm trước khi sử dụng, đây là một trong những yêu cầu quan trọng đảm bảo tính an toàn với tác nhân gây bệnh cho tinh dịch (Huyen Le Thi & Marshall., 2020).

*Âm đạo giả:* Về nguyên tắc cấu tạo chung, âm đạo giả sẽ gồm các bộ phận: ống nhựa cứng hình trụ, ống chứa tinh dịch sau khi thu nhận, một ống cao su mềm bền nhiệt có vai trò tạo nhiệt độ gần với nhiệt độ cơ thể động vật, ngoài ra âm đạo giả còn tạo được áp lực giống với âm đạo thật. Kích thước của âm đạo giả (AV) sẽ điều chỉnh phụ thuộc vào kích cỡ của

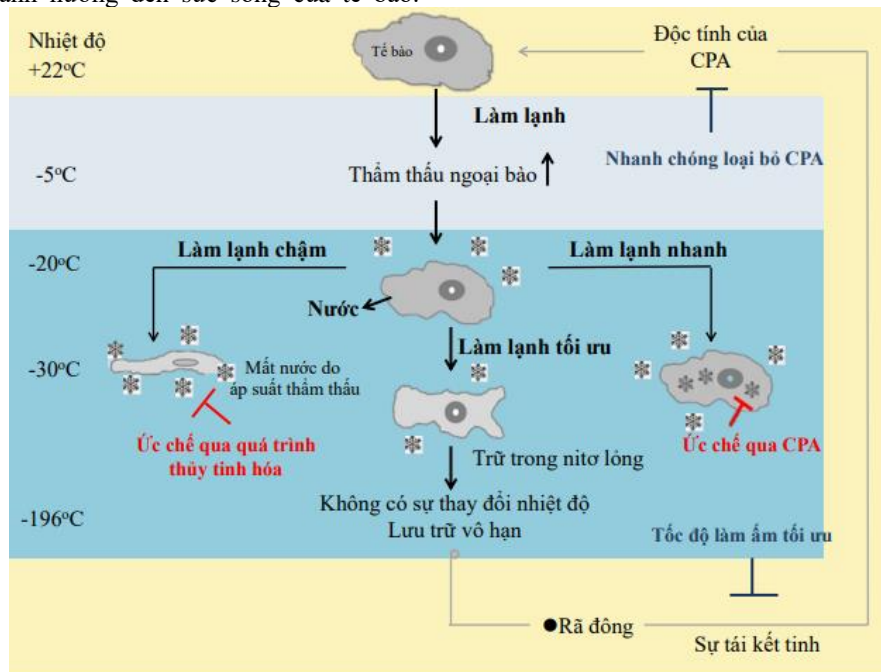
mỗi loài động vật thí nghiệm. Trước khi thu nhận tinh dịch con đực, âm đạo giả cần làm ấm với nhiệt độ thích hợp và bôi trơn ống hình trụ. Tùy vào mỗi loại động vật, việc kích thích con đực xuất tinh có thể sử dụng bằng giá nhảy như trên trâu, bò, ngựa (Aurich, 2012; Neglia et al., 2020) hoặc dùng con cái như trên dê, thỏ (Soliman & El-Sabrou, 2020).

Phương pháp sử dụng xung điện: Đối với những con đực giống hạn chế hợp tác với việc huấn luyện lấy tinh bằng âm đạo giả, phương pháp sử dụng xung điện là một giải pháp thích hợp và mang lại hiệu quả thu nhận tinh dịch cao. Đây là một thiết bị có đầu dò, đầu dò này sẽ đưa vào trực tràng, sau đó sử dụng xung điện để kích thích tạo phản ứng xuất tinh ở con đực và thu nhận tinh dịch bằng dụng cụ thu mẫu. Mặc dù phương pháp này thu nhận tinh dịch nhanh chóng và chất lượng tốt, nhưng hạn chế là phương pháp xâm lấn, gây tổn thương cho động vật, một số nghiên cứu cho thấy việc gia tăng các hormone như cortisol ở nhóm xung điện cao hơn so với nhóm sử dụng âm đạo giả (Yang, 2020).

*Các phương pháp đông lạnh tinh trùng động vật nuôi*

Bảo quản lạnh là việc sử dụng nhiệt độ thấp để bảo quản các tế bào và mô nguyên vẹn về mặt cấu trúc và chức năng (Pegg, 2002). Tuy nhiên, ở nhiệt độ thấp sẽ ảnh hưởng đến sức sống của tế bào.

Nguyên nhân của hiện tượng này là do nước trong tế bào sẽ đông băng và hình thành những tinh thể nước. Đây chính là nguyên nhân làm tế bào bị vỡ trong quá trình đông lạnh. Các tinh thể nước sẽ phá vỡ cơ học màng tế bào và các bào quan khác, do đó tế bào sẽ không còn nguyên vẹn sau khi trở về trạng thái bình thường, đồng thời nồng độ chất tan nội bào tăng khi nước hình thành tinh thể sẽ gây chết tế bào. Để giải quyết vấn đề này, trong nguyên lý của việc đông lạnh phải đảm bảo ít nhất hai yếu tố quan trọng: sử dụng chất bảo quản lạnh (cryoprotectants) và lựa chọn tốc độ làm lạnh và giải đông thích hợp (Rusco et al., 2019). Chất bảo quản lạnh là những chất có khả năng hòa tan trong nước cao ở nhiệt độ thấp, có thể dễ dàng đi qua màng sinh học và độ độc hại cho tế bào ở mức tối thiểu. Những chất bảo quản lạnh được sử dụng phổ biến trong đông lạnh tinh trùng cũng như các tế bào động vật khác là: glycerol, DMSO, ethylene glycol và propadiol. Việc quan trọng kế tiếp trong quá trình làm lạnh là sử dụng quá trình làm lạnh và giải đông. Sự thành công của quá trình bảo quản lạnh phụ thuộc vào việc tránh hình thành tinh thể đá nội bào và cân đối với việc sự di chuyển của nước qua màng tế bào được mô tả ở hình 2 (Jones & Shikanov, 2020). Vì thế, nguyên lý cơ bản và quan trọng nhất của việc đông lạnh là bảo vệ tế bào khỏi sự hình thành của tinh thể nước (Estudillo et al., 2021).



**Hình 2. Nguyên lý trong đông lạnh tế bào**

(Nguồn: Jones & Shikanov, 2020)

Việc đông lạnh tinh trùng người thực hiện từ cuối những năm 1940. Bắt đầu bằng việc glycerol được khám phá rằng có thể bảo vệ tinh trùng khỏi bị hư hại do đông lạnh đến việc tinh trùng người được bảo quản trên đá khô ở  $-79^{\circ}\text{C}$  được sử dụng (Polge et al., 1949). Sau đó việc sử dụng nitơ lỏng trong việc bảo quản lạnh tinh dịch đã phát triển nhanh chóng ở nhiều quốc gia với việc thành lập các ngân hàng tinh trùng thương mại (Perloff & Steinberger, 1964). Một loạt các quy trình bảo quản lạnh hiện đã và đang được sử dụng với các chất bảo quản lạnh và quy trình đông lạnh khác nhau. Sự sống sót của tế bào sau khi đông lạnh và rã đông phụ thuộc chủ yếu vào việc giảm thiểu sự hình thành tinh thể băng nội bào. Điều này được thực hiện bằng cách sử dụng chất bảo quản lạnh thích hợp và tốc độ đông lạnh và rã đông thích hợp để giảm thiểu lượng nước trong nội bào có thể hình thành tinh thể băng. Tuy nhiên, bảo quản lạnh có ảnh hưởng xấu đến chức năng tinh trùng người, đặc biệt là khả năng vận động của tinh trùng. Trung bình, chỉ có khoảng 50% số tinh trùng di động có thể tồn tại sau quá trình trữ lạnh và rã đông (Oberoi et al., 2014).

Có hai kỹ thuật đông lạnh thông thường chính được sử dụng trong bảo quản đông lạnh tinh trùng: đông lạnh chậm và phương pháp thủy tinh hóa.

#### *Đông lạnh chậm (slow-freezing)*

Kỹ thuật đông lạnh chậm do Behrman và Sawada (1966) đề xuất bằng cách làm lạnh tinh trùng với khoảng thời gian từ 2-4 giờ trong hai hoặc ba bước, được thực hiện bằng thủ công hoặc tự động hóa bằng cách sử dụng tủ đông đã được bán lập trình (Behrman & Sawada, 1966).

Phương pháp thủ công được thực hiện bằng cách đồng thời giảm nhiệt độ của tinh trùng khi vừa bổ sung chất bảo quản lạnh theo từng bước và sau khi nhúng mẫu vào nitơ lỏng. Tốc độ làm lạnh ban đầu tối ưu của mẫu từ nhiệt độ phòng xuống đến  $5^{\circ}\text{C}$  là  $0,5 - 1^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ . Sau đó, mẫu được hạ nhiệt độ từ  $5^{\circ}\text{C}$  đến  $-80^{\circ}\text{C}$  với tốc độ  $1 - 10^{\circ}\text{C}/\text{phút}$  và cuối cùng được nhúng vào nitơ lỏng ở  $-196^{\circ}\text{C}$  (Mahadevan & Trounson, 2009).

Dù phương pháp đông lạnh bằng thủ công vẫn được thực hiện thành công, nhưng hạn chế lớn nhất của phương pháp này là độ ổn định không cao và thất thoát hơi lạnh rất lớn. Do vậy, hệ thống làm lạnh tự động được nghiên cứu và phát triển. Hệ thống này sử dụng tấm kim loại để giữ các ống trữ lạnh và được làm lạnh trực tiếp bằng nitơ lỏng. Nitơ lỏng được đổ vào bể chứa và máy sẽ được lập trình sử dụng phần mềm ghi dữ liệu để làm lạnh tự động từ  $20^{\circ}\text{C}$  đến  $-80^{\circ}\text{C}$  với tốc độ  $1,5^{\circ}\text{C}/\text{phút}$  và sau đó

ở  $6^{\circ}\text{C}/\text{phút}$ . Khi hoàn thành quá trình đông lạnh, ống trữ lạnh chuyên dụng được lấy ra và bảo quản trong nitơ lỏng ở  $-196^{\circ}\text{C}$ . Tổng quá trình này mất khoảng 40 phút (Holt, 2000). Tùy vào mỗi loại tế bào và mỗi loại mô mà có quy trình làm lạnh khác nhau. Ưu điểm của phương pháp này là cân bằng việc di chuyển của nước và hạ nhiệt độ nên độ tỉ lệ sống của tế bào sau khi giải đông rất cao. Tuy nhiên, hạn chế của phương pháp này là thời gian kéo dài và yêu cầu thiết bị làm lạnh chuyên dụng (Santo et al., 2012).

#### *Phương pháp thủy tinh hóa*

Đây là phương pháp làm lạnh tinh trùng với thời gian rất nhanh mà toàn bộ khối vật chất bên trong và bên ngoài tế bào sẽ chuyển thành dạng khối đặc, trong suốt như thủy tinh trong quá trình giảm nhiệt độ. Tinh trùng sẽ được nhúng trực tiếp vào nitơ lỏng cộng với nồng độ chất bảo quản lạnh được sử dụng khá cao. Điều này sẽ tránh được sự hình thành tinh thể đá bên trong cũng như bên ngoài tế bào trong quá trình làm lạnh.

Phương pháp này được Rall và Fahy (1985) thực hiện thành công đầu tiên trên phôi bò và sau đó được thực hiện rộng rãi trên gia súc vào nhiều năm sau đó (Rall & Fahy, 1985). Kuleshova và Lopate (1999) đã ứng dụng thành công phương pháp này để trữ lạnh trứng của người (Kuleshova et al., 1999). Phương pháp thủy tinh hóa ngoài sử dụng tốc độ làm lạnh cao mà còn sử dụng nồng độ cao các chất bảo quản lạnh để tránh tạo tinh thể đá trong quá trình đông lạnh cũng như rã đông (Loutradi et al., 2008; Son et al., 2009). Phương pháp này giúp đông lạnh đơn giản, dễ thực hiện mà lại tiết kiệm được thời gian, nguyên liệu và trang thiết bị. Hiện nay, đông lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa là một kỹ thuật đang được ứng dụng rộng rãi trong nghiên cứu và cả trong ứng dụng điều trị.

Trong suốt quá trình phát triển của kỹ thuật thủy tinh thể, thay thế cho phương pháp đông lạnh chậm, môi trường được sử dụng luôn được thay đổi và phát triển, chủ yếu là việc kết hợp các chất bảo quản lạnh không thấm thấu để giảm tổn thương tế bào. Những năm gần đây, đã có rất nhiều nghiên cứu phương pháp thủy tinh hóa nhưng không sử dụng chất bảo quản lạnh cũng mang lại những kết quả khả thi (Sanchez et al, 2015). Mặc dù kỹ thuật này có những ưu điểm trong việc điều chỉnh khả năng phục hồi áp suất thẩm thấu và có những kết quả đáng kể trên tế bào tinh trùng người (Aizpurua et al., 2017), việc sử dụng quy trình này ở động vật như gia súc, gia cầm vẫn chưa có kết quả khả quan. Ở gia súc, những nghiên cứu cho thấy tỉ lệ tinh trùng sống và di động rất thấp khi áp dụng phương pháp thủy tinh thể

(Yáñez-Ortiz et al., 2021). Ở trên heo, quá trình thụ tinh hóa giảm rõ rệt khả năng vận động, khả năng tồn tại và tính toàn vẹn acrosome của tinh trùng (Arraztoa et al., 2017; My và ctv., 2021). Kết quả giảm chất lượng tinh trùng sau khi giải đông cũng có kết quả tương tự, hiệu quả thấp hơn so với phương pháp đông lạnh chậm cũng ở cừu, dê, gia cầm ( Long et al., 2010); Jiménez-Rabadán et al., 2015; Agossou & Koluman, 2018).

#### 4. THẢO LUẬN

Vì khả năng lưu trữ lâu dài, cryobank hay bảo quản lạnh là một trong những công cụ hữu ích không những sản xuất những con giống sạch bệnh mà còn để cải thiện chọn lọc, cải biến di truyền và bảo tồn nguồn gene. Chính vì tầm quan trọng của việc bảo quản lạnh mà trong kế hoạch toàn cầu của mình, FAO đã kiến nghị thực hiện các chương trình bảo tồn nguồn gene động vật vì thế mà trên thế giới đã có rất nhiều ngân hàng gene đông lạnh ra đời. Tại Việt Nam, nhận thấy tầm quan trọng của ứng dụng cryobank và công nghệ sinh học trong chăn nuôi, vào ngày 12 tháng 01 năm 2006, Thủ Tướng chính phủ đã phê duyệt “Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020”. Ở QĐ số 11/2006/QĐ-TTg trong đó ghi rất rõ nội dung: “Nghiên cứu cải tiến và ứng dụng các công nghệ tế bào động vật tiên tiến để nâng cao hiệu quả sinh sản của vật nuôi; phục vụ tốt cho công tác lưu giữ, bảo quản, bảo tồn các tế bào sinh dục và đánh giá chất lượng vật nuôi; ứng dụng phương pháp cấy phôi và cải tiến phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm phục vụ lĩnh vực sinh sản động vật. Ứng dụng rộng rãi các công nghệ tinh, phôi đông lạnh trong việc lưu giữ, bảo quản và bảo tồn lâu dài quỹ gene bản địa, quý hiếm ở vật nuôi”. Quyết định số 1520/2020/QĐ-TTg, ngày 6 tháng 10 năm 2020 về Chiến lược phát triển chăn nuôi 2021-2030, tầm nhìn 2045, trong đó, những đề án được đưa lên hàng đầu trong Quyết định này là “nghiên cứu những công nghệ sản xuất vật nuôi”. Tuy nhiên, trên thực tế, cho đến nay (tháng 09 năm 2022) việc ứng dụng công nghệ sinh sản trong chăn nuôi ở Việt Nam nói chung và vùng đồng bằng sông Cửu Long nói riêng là rất hạn chế. Như theo sơ đồ ở Hình 1, có thể nói, việc ứng dụng công nghệ sinh học sinh sản ở vùng ĐBSCL chỉ mới ở thể hệ thứ nhất, trong khi các nước trên thế giới và trong khu vực đã phát triển đến

các thể hệ ba và bốn. Thể hệ thứ nhất là ứng dụng gieo tinh nhân tạo, kỹ thuật này đã được đưa vào Việt Nam và ứng dụng rất thành công từ những năm 1970. Trong đó chỉ tập trung trên 2 đối tượng vật nuôi là gieo tinh nhân tạo tinh đông lạnh cọng rạ trên bò và tinh dịch tươi trên heo, còn các gia súc, gia cầm khác đều là giao phối tự nhiên. Đối với tinh đông lạnh, hầu hết đều là tinh nhập khẩu từ nước ngoài, thuận lợi của việc nhập khẩu là tận dụng được nguồn gene về tình trạng trội trên năng suất của con đực. Bên cạnh những hiệu quả tích cực mang lại từ việc sử dụng tinh ngoại nhập, công tác này còn gặp phải một số hạn chế như: giống ngoại chưa thích nghi với điều kiện dinh dưỡng, chăm sóc và đặc biệt là khí hậu nóng ẩm của Việt Nam; giá thành tinh động vật nhập ngoại khá cao. Vì vậy, kỹ thuật này chưa được nhân rộng, đặc biệt đến trang trại nhỏ và nông hộ. Hơn thế nữa, tình hình dịch bệnh đang ngày càng phức tạp, đồng thời sự yêu cầu của phát triển kinh tế đất nước mà quy mô chăn nuôi nhỏ lẻ, nông hộ đang dần thay thế cho những trang trại lớn. Với quy mô nhỏ, việc gia tăng số lượng đàn bằng phương pháp giao phối tự nhiên có thể chấp nhận được. Tuy nhiên, nếu quy mô trang trại lớn hàng ngàn con vật nuôi thì việc áp dụng cryobank và gieo tinh nhân tạo và cấy truyền phôi là rất cần thiết để phát triển ổn định, quy mô, có kiểm soát và đạt hiệu quả cao. Như vậy, lĩnh vực cryobank và công nghệ sinh học sinh sản cần phải được quan tâm và đầu tư hơn nữa về phát triển nguồn nhân lực, về trang thiết bị máy móc, đặc biệt là ưu tiên phát triển từ các ban ngành địa phương, các doanh nghiệp để nghiên cứu, phát triển và áp dụng cryobank trên các loài động vật khác nhau nhằm sản xuất con giống sạch bệnh với số lượng lớn, đồng thời lai tạo bảo tồn những động vật mang tính trạng tốt thích nghi với biến đổi khí hậu mà nguồn tinh, nguồn phôi nhập khẩu không thể có được, đồng thời lưu trữ những nguồn gene quý bản địa của từng địa phương.

#### 5. KẾT LUẬN

Cryobank tinh trùng vật nuôi kết hợp với các kỹ thuật công nghệ sinh học sinh sản là giải pháp không những sản xuất nhanh con giống sạch bệnh sau dịch bệnh, mà còn là cơ sở lai tạo giống động vật nhanh mang kiểu hình và kiểu gene tốt về năng suất và thích nghi với điều kiện biến đổi khí hậu tại địa phương.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Agca, Y. (2012). Genome resource banking of biomedically important laboratory animals. *Theriogenology*, 78(8), 1653–1665. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.08.012>
- Agossou, D. J., & Koluman, N. (2018). The effects of natural mating and artificial insemination using cryopreserved buck semen on reproductive performance in Alpine goats. *Archives Animal Breeding*, 61(4), 459–461. <https://doi.org/10.5194/aab-61-459-2018>
- Aizpurua, J., Medrano, L., Enciso, M., Sarasa, J., Romero, A., Fernández, M. A., & Gómez-Torres, M. J. (2017). New permeable cryoprotectant-free vitrification method for native human sperm. *Human Reproduction*, 32(10), 2007–2015. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex281>
- Annandale, C. H., Smuts, M. P., Ebersohn, K., du Plessis, L., Venter, E. H., & Stout, T. A. E. (2018). Effect of semen processing methods on lumpy skin disease virus status in cryopreserved bull semen. *Animal Reproduction Science*, 195, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.04.080>
- Araztoa, C. C., Miragaya, M. H., Chaves, M. G., Trasorras, V. L., Gambarotta, M. C., & Neild, D. M. (2017). Porcine sperm vitrification II: Spheres method. *Andrologia*, 49(8), e12738. <https://doi.org/10.1111/and.12738>
- Aurich, J. E. (2012). Artificial Insemination in Horses—More than a Century of Practice and Research. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.011>
- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, 10(1), 49–62. <https://doi.org/10.1007/s10561-008-9081-4>
- Behrman, S. J., & Sawada, Y. (1966). Heterologous and Homologous Inseminations with Human Semen Frozen and Stored in a Liquid-Nitrogen Refrigerator. *Fertility and Sterility*, 17(4), 457–466. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)36003-4](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)36003-4)
- Blackburn, H. D. (2009). Genebank development for the conservation of livestock genetic resources in the United States of America. *Livestock Science*, 120(3), 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.07.004>
- Blesbois, E., Seigneurin, F., Grasseau, I., Limouzin, C., Besnard, J., Gourichon, D., Coquerelle, G., Rault, P., & Tixier-Boichard, M. (2007). Semen Cryopreservation for Ex Situ Management of Genetic Diversity in Chicken: Creation of the French Avian Cryobank. *Poultry Science*, 86(3), 555–564. <https://doi.org/10.1093/ps/86.3.555>
- Bratton, R. W., Foote, R. H., & Cruthers, J. C. (1955). Preliminary Fertility Results with Frozen Bovine Spermatozoa. *Journal of Dairy Science*, 38(1), 40–46. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(55\)94935-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(55)94935-3)
- Bunge, R. G., & Sherman, J. K. (1953). Fertilizing Capacity of Frozen Human Spermatozoa. *Nature*, 172(4382), 767–768. <https://doi.org/10.1038/172767b0>
- Burrows, W. H., & Quinn, J. P. (1937). The Collection of Spermatozoa from the Domestic Fowl and Turkey. *Poultry Science*, 16(1), 19–24. <https://doi.org/10.3382/ps.0160019>
- Bwanga, C. O., Braganca, M. M., Einarsson, S., & Rodriguez-Martinez, H. (1990). Cryopreservation of Boar Semen in Mini- and Maxi-Straws. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 37(1–10), 651–658. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1990.tb00958.x>
- Chánh, T & Vũ, V. (2022). *Khôi phục đàn heo giống hạt nhân, tạo tiền đề chăn nuôi bền vững*. <https://nongnghiep.vn/khoi-phuc-dan-heo-giong-hat-nhan-tao-tien-de-chan-nuoi-ben-vung-d325059.html>
- Critser, J. K., & Russell, R. J. (2000). Genome Resource Banking of Laboratory Animal Models. *ILAR Journal*, 41(4), 183–186. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.183>
- Crum, T. E., Schnabel, R. D., Decker, J. E., Regitano, L. C. A., & Taylor, J. F. (2019). CRUMBLER: A tool for the prediction of ancestry in cattle. *PLOS ONE*, 14(8), e0221471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221471>
- de Sousa, R. V., da Silva Cardoso, C. R., Butzke, G., Dode, M. A. N., Rumpf, R., & Franco, M. M. (2017). Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. *Theriogenology*, 90, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.003>
- Dhama, K., Singh, R. P., Karthik, K., Chakrabort, S., Tiwari, R., Wani, M. Y., & Mohan, J. (2014). Artificial Insemination in Poultry and Possible Transmission of Infectious Pathogens: A Review. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(4), 211–228. <https://doi.org/10.3923/ajava.2014.211.228>
- Dương, N.X. (2022). *Ngành chăn nuôi 2022: Nhận diện thách thức, tập trung giải pháp*. <http://nhachannuoi.vn/nganh-chan-nuoi-2022-nhan-dien-thach-thuc-tap-trung-giai-phap/>
- Estudillo, E., Jiménez, A., Bustamante-Nieves, P. E., Palacios-Reyes, C., Velasco, I., & López-Ornelas, A. (2021). Cryopreservation of Gametes and Embryos and Their Molecular Changes. *International Journal of Molecular Sciences*,

- 22(19), 10864.  
<https://doi.org/10.3390/ijms221910864>
- FAO. (2012). Cryoconservation of Animal Genetic Resources; FAO Animal Production and Health Guidelines No. 12; FAO: Rome, Italy.
- Givens, M. D. (2018). Review: Risks of disease transmission through semen in cattle. *Animal*, 12, s165–s171.  
<https://doi.org/10.1017/S1751731118000708>
- Groeneveld, L. F., Gregusson, S., Guldbandsen, B., Hiemstra, S. J., Hveem, K., Kantanen, J., Lohi, H., Stroemstedt, L., & Berg, P. (2016). Domesticated Animal Biobanking: Land of Opportunity. *PLOS Biology*, 14(7), e1002523.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002523>
- Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47–58. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00239-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00239-3)
- Iaffaldano, N., Di Iorio, M., Rusco, G., Antenucci, E., Zaniboni, L., Madeddu, M., Marelli, S., Schiavone, A., Soglia, D., Buccioni, A., Cassandro, M., Castellini, C., Marzoni, M., & Cerolini, S. (2021). Italian semen cryobank of autochthonous chicken and turkey breeds: A tool for preserving genetic biodiversity. *Italian Journal of Animal Science*, 20(1), 2022–2033.  
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2021.1993094>
- Jiménez-Rabadán, P., García-Álvarez, O., Vidal, A., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Ramón, M., del Olmo, E., Fernández-Santos, R., Garde, J. J., & Soler, A. J. (2015). Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, 71(1), 85–90.  
<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.05.004>
- Jones, A. S. K., & Shikanov, A. (2020). Ovarian Tissue Cryopreservation and Novel Bioengineering Approaches for Fertility Preservation. *Current Breast Cancer Reports*, 12(4), 351–360.  
<https://doi.org/10.1007/s12609-020-00390-z>
- Kuleshova, L., Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A., & Trounson, A. (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: Case Report. *Human Reproduction*, 14(12), 3077–3079.  
<https://doi.org/10.1093/humrep/14.12.3077>
- Leroy, G., Boettcher, P., Besbes, B., Danchin-Burge, C., Baumung, R., & Hiemstra, S. J. (2019). Cryoconservation of Animal Genetic Resources in Europe and Two African Countries: A Gap Analysis. *Diversity*, 11(12), 240.  
<https://doi.org/10.3390/d11120240>
- Long, J. A., Bongalhardo, D. C., Pelaéz, J., Saxena, S., Settar, P., O’Sullivan, N. P., & Fulton, J. E. (2010). Rooster semen cryopreservation: Effect of pedigree line and male age on postthaw sperm function. *Poultry Science*, 89(5), 966–973.  
<https://doi.org/10.3382/ps.2009-00227>
- Loutradi, K. E., Kolibianakis, E. M., Venetis, C. A., Papanikolaou, E. G., Pados, G., Bontis, I., & Tarlatzis, B. C. (2008). Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: A systematic review and meta-analysis. *Fertility and Sterility*, 90(1), 186–193.  
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.06.010>
- Mahadevan, M., & Trounson, A. O. (2009). Effect of Cooling, Freezing and Thawing Rates and Storage Conditions on Preservation of Human Spermatozoa. *Andrologia*, 16(1), 52–60.  
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.1984.tb00234.x>
- Martins Pereira, E. C., Silva, A., da Costa, E. P., & Real Pereir, C. E. (2013). The Potential for Infectious Disease Contamination During the Artificial Insemination Procedure in Swine. In A. Lemma (Ed.), *Success in Artificial Insemination—Quality of Semen and Diagnostics Employed*. InTech. <https://doi.org/10.5772/52337>
- Matukumalli, L. K., Lawley, C. T., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., Allan, M. F., Heaton, M. P., O’Connell, J., Moore, S. S., Smith, T. P. L., Sonstegard, T. S., & Van Tassell, C. P. (2009). Development and Characterization of a High Density SNP Genotyping Assay for Cattle. *PLoS ONE*, 4(4), e5350.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005350>
- My, L. H., Phuoc, M. B. T., Tuyen, D. N. D., & Khuong, T. T. T. (2021) Đông lạnh tinh trùng lợn bằng phương pháp thủy tinh hóa. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 7, 116-121
- Neglia, G., de Nicola, D., Esposito, L., Salzano, A., D’Occhio, M. J., & Fatone, G. (2020). Reproductive management in buffalo by artificial insemination. *Theriogenology*, 150, 166–172.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.016>
- Nguyễn, B. (2022). Ngành chăn nuôi thiệt hại nặng vì dịch, bệnh. <http://www.baodongnai.com.vn/tieu-diem/202202/nganh-chan-nuoi-thiet-hai-nang-vi-dich-benh-3104046/index.htm>
- Oberoi, B., Kumar, S., & Talwar, P. (2014). Study of human sperm motility post cryopreservation. *Medical Journal Armed Forces India*, 70(4), 349–353. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.09.006>
- Obuchi, T., Osada, M., Ozawa, T., Nakagawa, H., Hayashi, M., Akiyama, K., Sakagami, N., Miura, R., Geshi, M., & Ushijima, H. (2019). Comparative evaluation of the cost and efficiency of four types of sexing methods for the production of dairy female calves. *Journal of Reproduction and Development*, 65(4), 345–352.  
<https://doi.org/10.1262/jrd.2019-028>
- Pegg, D. E. (2002). The History and Principles of Cryopreservation. *Seminars in Reproductive*

- Medicine*, 20(1), 005–014.  
<https://doi.org/10.1055/s-2002-23515>
- Perloff, W. H., & Steinberger, E. (1964). In vivo survival of spermatozoa in cervical mucus. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 88(4), 439–442. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(64\)90499-5](https://doi.org/10.1016/0002-9378(64)90499-5)
- Perry, G. (2014). *2013 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.22202.59842>
- Polge, C., Smith, A. U., & Parkes, A. S. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164(4172), 666–666. <https://doi.org/10.1038/164666a0>
- Ponsart, C., Le Bourhis, D., Knijn, H., Fritz, S., Guyader-Joly, C., Otter, T., Lacaze, S., Charreaux, F., Schibler, L., Dupassieux, D., & Mullaart, E. (2014). Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 26(1), 12. <https://doi.org/10.1071/RD13328>
- Quang, T. (2020) “*Đặt hàng*” doanh nghiệp cung cấp lợn giống cho người chăn nuôi. <https://danviet.vn/dat-hang-doanh-nghiep-cung-cap-lon-giong-cho-nguoi-chan-nuoi-1085623.htm>
- Quyết định số 11/2006/QĐ-TTg, của Thủ tướng Chính phủ, ngày 12 tháng 01 năm 2006 về việc phê duyệt “Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020”
- Quyết định số 1520/2020/QĐ-TTg, của Thủ tướng Chính phủ, ngày 6 tháng 10 năm 2020 về việc phê duyệt “chiến lược phát triển chăn nuôi 2021-2030, tầm nhìn 2045”.
- Rall, W. F., & Fahy, G. M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  by vitrification. *Nature*, 313(6003), 573–575. <https://doi.org/10.1038/313573a0>
- Rusco, G., Di Iorio, M., Gibertoni, P. P., Esposito, S., Penserini, M., Roncarati, A., Cerolini, S., & Iaffaldano, N. (2019). Optimization of Sperm Cryopreservation Protocol for Mediterranean Brown Trout: A Comparative Study of Non-Permeating Cryoprotectants and Thawing Rates In Vitro and In Vivo. *Animals*, 9(6), 304. <https://doi.org/10.3390/ani9060304>
- Shaffner, C. S., Henderson, E. W., & Card, C. G. (1941). Viability of Spermatozoa of the Chicken Under Various Environmental Conditions. *Poultry Science*, 20(3), 259–265. <https://doi.org/10.3382/ps.0200259>
- Smith, J. L., Wilson, M. L., Nilson, S. M., Rowan, T. N., Schnabel, R. D., Decker, J. E., & Seabury, C. M. (2022). Genome-wide association and genotype by environment interactions for growth traits in U.S. Red Angus cattle. *BMC Genomics*, 23(1), 517. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08667-6>
- Soliman, F., & El-Sabrou, K. (2020). Artificial insemination in rabbits: Factors that interfere in assessing its results. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*, 8(2), 120–130. <https://doi.org/10.31893/jabb.20016>
- Squires, E. L., McCue, P. M., & Vanderwall, D. (1999). The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, 51(1), 91–104. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00234-9)
- Thibier, M., & Wagner, H.-G. (2002). World statistics for artificial insemination in cattle. *Livestock Production Science*, 74(2), 203–212. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(01\)00291-3](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(01)00291-3)
- Tomka, J., Huba, J., & Pavlík, I. (2022). State of conservation of animal genetic resources in Slovakia. *Genetic Resources*, 3(6), 49–63. <https://doi.org/10.46265/genresj.XRHU9134>
- van Wagendonk-de Leeuw, A. M. (2006). Ovum Pick Up and In Vitro Production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. *Theriogenology*, 65(5), 914–925. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.007>
- Viana, J. (2019). 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 36(4), 17.
- Walters, E. M., Benson, J. D., Woods, E. J., & Critser, J. K. (2009). The history of sperm cryopreservation. In A. A. Pacey & M. J. Tomlinson (Eds.), *Sperm Banking* (1st ed., pp. 1–17). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139193771.002>
- Wiebke, M., Hensel, B., Nitsche-Melkus, E., Jung, M., & Schulze, M. (2021). Cooled storage of semen from livestock animals (part I): Boar, bull, and stallion. *Animal Reproduction Science*, 106822. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106822>
- Woelders, H., Windig, J., & Hiemstra, S. (2012). How Developments in Cryobiology, Reproductive Technologies and Conservation Genomics Could Shape Gene Banking Strategies for (Farm) Animals: Technologies of Animal Gene Banking. *Reproduction in Domestic Animals*, 47, 264–273. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02085.x>
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., & Yeste, M. (2021). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 106904. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>
- Yang, S. (2020). Assisted reproductive technologies in nonhuman primates. In *Reproductive Technologies in Animals* (pp. 181–191). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817107-3.00012-6>