

台灣土雞精子冷凍保存後之存活率、受精率及其受精卵之孵化率⁽¹⁾

劉振發^{(2) (5)} 吳明哲⁽³⁾ 劉曉龍⁽⁴⁾ 劉瑞珍⁽²⁾ 黃祥吉⁽⁴⁾

收件日期：92 年 4 月 23 日；接受日期：92 年 6 月 6 日

摘 要

生殖細胞的保存是一項有效保存遺傳資源的方法。本研究的目的是針對台灣土雞遺傳資源的保存，而研發精子的急速冷凍技術。利用畜產試驗所保有的台灣土雞，採集 5 隻公雞的精液後，將其混合，再加入等量的 12% dimethylacetamide (DMA) 抗凍液，就置於冰塊間於 0℃ 平衡 10 分鐘後，立即以微量滴管將含有抗凍劑的精液以小滴（約 20~25 μ l）的形態滴入液態氮中製成粒狀精液，並將 12~15 粒的冷凍精液裝入冷凍小瓶保存。抗凍液是以市售豬精液稀釋用速保精溶液來溶入 12% DMA。粒狀冷凍精液的解凍步驟是先將 0.4 ml 的速保精溶液裝入玻璃小瓶，置於 60℃ 恆溫水槽中 1~2 分鐘後取出，再將冷凍小瓶內的粒狀精液迅速倒入玻璃小瓶混合，隨即將解凍後的精液置於冰塊間，攜至現場進行母雞人工授精測試。分別在熱季（七月）與涼季（一月）進行測試。授精時間為下午 3 點，共 60 隻母雞分為 A、B 兩組各 30 隻，A 組為每天授精一次，連續授精 3 天；B 組為僅授精一次。解凍精子的存活檢測是以 SYBR-14 和 PI 螢光染劑進行，解凍後精子的存活率為 45-50%。授精後 1-7 天撿蛋，孵蛋後的第 7 天進行照蛋檢查受精率；熱季之受精率與受精蛋孵化率分別為 A 組 50% (40/80) 與 95% (38/40)、B 組 20% (14/69) 與 86% (12/14)；涼季之受精率與受精蛋孵化率分別為 A 組 90% (73/81) 與 96% (70/73)；B 組 70% (53/76) 與 92% (49/53)。依據本試驗結果顯示以粒狀冷凍精液進行台灣土雞的種原保存是可行的，但建議以涼季來進行種原繁衍會有較好的授精率。

關鍵詞：雞精子、急速冷凍、存活率、受精率、孵化率。

緒 言

台灣土雞的保種工作肇始於 1982 年，由國立中興大學李淵百博士率先著手進行，分別由台灣七個不同的地區蒐集並保存當地土雞。各雞種迄今已繁衍七至八代以上，但因在小族群的保種下，已出現近親衰退的問題（陳等，1994）。故為了保存這些遺傳資源，除了擴大族群的數目外，生殖細胞的保存亦是一項有效保存這些遺傳資源的方法。然而，在母禽類其生殖細胞的保存有其先天的限制，無法與哺乳類一般能取其卵母細胞或胚來進行種原的保存，故目前僅能在雄性禽類取其精細胞來保

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1193 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

- (3) 行政院農業委員會畜產試驗所新竹分所。
- (4) 行政院農業委員會畜產試驗所產業組。
- (5) 通訊作者。

存。國外因種原保存的目的而發展出的家禽冷凍精液，其受精率顯然不如新鮮精液 (Watanabe *et al.*, 1975; Sexton, 1981; Wishart, 1985; Khovnir *et al.*, 1985; Lake, 1986)；一個製作成功的冷凍精液必須在其解凍後還能維持有理想的授精率，在哺乳類的精液經過冷凍與解凍的過程中會 40-50% 的精子死亡。然而，在製作冷凍精液的過程中有幾個因素對解凍後的精液能否有理想的授精率是有密切的關聯，如稀釋液的種類、抗凍劑的種類、冷凍與解凍的速率和解凍後對有害物質（如甘油）的移除等 (Buss, 1993)。直到 Tselutin *et al.* (1999) 以粒狀精液的形式來進行冷凍保存才有明顯的改善。而在國內台灣土雞的生殖細胞冷凍保存之研究文獻付之闕如，相關的研究僅有江等(1991)和黃及洪 (2002) 探討有關台灣土雞精液經短時間低溫保存或添加稀釋液保存，對其受精率與孵化率之影響。除此之外，就沒有其他的報告，故本研究的目的是探討台灣土雞精子經急速冷凍解凍後之存活率、受精率與孵化率，以做為另一種台灣土雞種原保存的方式。

材料與方法

I. 公雞的精液採集

利用畜產試驗所保有的台灣土雞，以按摩法 (Lake, 1957) 採集 5 隻公雞的混合精液 (圖 1)，平均每隻公雞每次所採集的精液量約 0.3 ml，精液濃度約為 $4.5-5 \times 10^9/\text{ml}$ 。每隻公雞每次所採集的精液先以顯微鏡檢查，活力需在 4+ 以上，死精率 < 10%，達此標準的精液才將其混合，再進行冷凍精液的製備。

II. 冷凍精液的製備

將活力在 4+ 以上，死精率 < 10% 的公雞精液混合，加入等量含有 12% dimethylacetamide (DMA) 的抗凍液，兩者混合均勻後置於冰塊間於 0°C 平衡 10 分鐘後，立即以微量滴管將含有抗凍劑的精液以小滴 (約 20~25 μl) 的形態滴入液態氮中製成粒狀精液 (圖 2)，並將 12~15 粒的冷凍精液裝入冷凍小瓶保存。抗凍液是以市售速保精溶液 (豬精液稀釋用 500 ml 瓶裝，內含 33 g dextrose monohydrate、1.85 mg sodium citrate dihydrate、1.85 g EDTA、0.8 g sodium bicarbonate、250 mg ampicillin sodium 和 250 mg dihydrostreptomycin sulfate) 來溶入 12% DMA。



圖 1. 公雞精液的採集

Fig. 1. Semen collection of chicken.



圖 2. 製作雞冷凍粒狀精液

Fig. 2. Chicken frozen sperm pellets in processing.

III. 精液的解凍及存活率檢測

粒狀冷凍精液的解凍步驟是先將 0.4 ml 的速保精溶液裝入玻璃小瓶，置於 60°C 恆溫水槽中 1~2 分鐘後取出，再將冷凍小瓶內的粒狀精液 (12~15 粒) 迅速倒入玻璃小瓶混合，隨即將解凍後的精液置於冰塊間 (圖 3)，解凍精子的存活是以 SYBR-14 和 PI 螢光染劑進行檢測。SYBR-14 是一種專染精子核內 DNA 的非致死性螢光染色劑，可輕易的滲透過精子的細胞膜而去結合存活細胞的 DNA。PI 則染已失去活性的精子。SYBR-14 原液濃度為 1 mM，以 DMSO (dimethyl

sulfoxide) 稀釋 100 倍後使用。PI 原液濃度為 2.4 mM。取 PI (propidium iodide) 原液及已稀釋的 SYBR-14 溶液各 1 μ l，再加入解凍後的精液 10 μ l 混合，然後以螢光顯微鏡於 488 nm 波長條件下進行解凍後的精子存活率的檢測 (駱等, 1995)。

IV. 解凍精液的受精率與孵化率測試

解凍後的精液置於冰塊間 (圖 3)，攜至現場進行母雞人工授精 (圖 4)，每隻母雞每次的授精量為 0.08-0.1 ml (精液濃度約為 1×10^9 /ml，其中活精子數約為 5×10^8 /ml)，授精的時間為下午三點。計有 60 隻母雞，分為 A、B 兩組各 30 隻，A 組為每天授精一次，連續授精 3 天；B 組為僅授精一次；且分別在熱季 (七月) 與涼季 (一月) 進行測試。A、B 兩組均從第一天授精後的隔天開始持續檢蛋 7 天，並將每天所產的蛋標示。受精率檢測是於孵蛋後的第 7 天進行照蛋檢查，並於孵蛋後的第 21 天計算受精蛋的孵化率 [孵化率 = (孵出雛雞數 / 受精蛋) $\times 100$]。

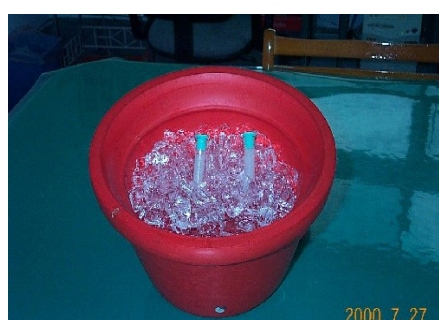


圖 3. 雞精液解凍後置於冰中

Fig. 3. Frozen-thawed chicken spermatozoa into icecube.



圖 4. 人工授精

Fig. 4. Artificial insemination.

結果與討論

I. 冷凍精液解凍後之精子存活率檢測

精子的活力檢測，一般均是在顯微鏡下觀察精子前進泳動能力的情形來判讀，但是經常會發生因活精子的泳動而將周圍死亡的精子一併帶動，因此以一般的顯微鏡檢測，在精子存活率的判斷上並不容易。本試驗之精子存活率檢測是以 SYBR-14 和 PI (propidium iodide) 螢光染劑進行檢測 (駱等, 1995; Chalah *et al.*, 1999)。SYBR-14 是一種專染精子核內 DNA 的非致死性螢光染色劑，可輕易的滲透過精子的細胞膜而去結合存活細胞的 DNA；PI 則染已失去活性的精子。因此，把 SYBR-14 和 PI 混合液來染精子時用螢光顯微鏡以 488 nm 波長鏡檢，即可區分活的 (呈現綠色螢光) 和死的 (呈現紅色螢光) 精子。據 Chalah *et al.* (1999) 以 SYBR-14 和 PI 螢光染劑及傳統的 eosin 和 nigrosin 方法染色進行家禽精液的活精子檢查，相同的精液樣品在新鮮時與在冷凍前以三種抗凍劑 (Glyc, DMA, DMF) 平衡處理後的活精子檢查比較，結果利用 SYBR-14 和 PI 螢光染劑檢測新鮮時與冷凍前以三種抗凍劑平衡處理後的活精子數 (新鮮為 83%、Glyc 為 73%、DMA 為 74%、DMF 為 72%)，兩者比較有顯著差異；但是利用 eosin 和 nigrosin 檢測的結果 (新鮮為 88%、Glyc 為 86%、DMA 為 87%、DMF 為 88%) 兩者比較沒有差異。因此，Chalah *et al.* (1999) 建議家禽精子的存活檢測以 SYBR-14 和 PI 螢光染劑進行會比 eosin 和 nigrosin 的方法更適合。然而；影響冷凍精液解凍後精子的存活率，除了抗凍劑的種類與冷凍的方法外，解凍的溫度亦是關鍵之一，Tselutun *et al.* (1999) 指出粒狀的冷凍精液，快速解凍的方式效果較好。

本實驗解凍方式亦是使用快速解凍的方式來進行。冷凍的粒狀精液 (12~15 粒) 加入 60°C 之速保精溶液 0.4 ml 進行快速解凍，解凍後的精液置於冰塊間，解凍精子的存活是以 SYBR-14

和 PI 螢光染劑進行檢測，結果解凍精子的存活率為 45~50% (圖 5)，活力 3+以上。

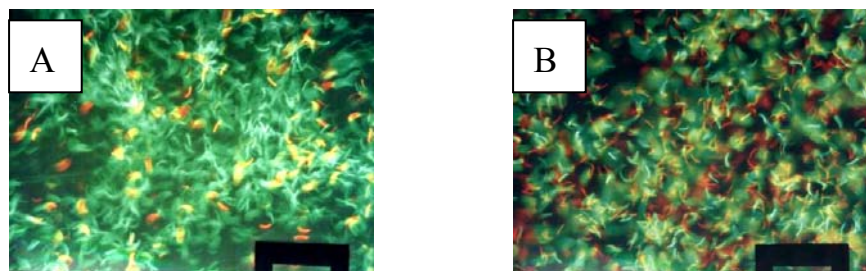


圖 5. 利用 SYBR-14 及 PI 螢光染劑進行精液存活率檢測；綠色螢光為活的精子，黃色螢光為垂死的精子，紅色螢光為死的精子。A 為新鮮精液。B 為冷凍解凍的精液。鏡檢倍數是 400 和度量孔徑是 50 μ m。

Fig. 5. Survival of frozen-thawed spermatozoa was examined with SYBR-14 and PI fluorescent stain. Green color was live, yellow color was dying, red color was death. A. Fresh spermatozoa. B. Frozen-thawed spermatozoa. Scale slit shows 50 μ m at 400X.

II. 解凍精液的受精率與孵化率測試

檢測期間每天所撿的蛋均標示日期，暫存於貯蛋室內(溫度 15°C、相對濕度 70%)，於七天內熱季 A 組與 B 組共撿蛋 80 顆與 69 顆；涼季 A 組與 B 組共撿蛋 81 顆與 76 顆。試驗蛋在入蛋孵化前，所有試驗蛋從貯蛋室內取出，先置於室溫 4 到 6 小時使其回溫，再將其送入孵化器內進行孵化。試驗蛋在孵化後的第 7 天進行照蛋檢測受精率，並於孵蛋後的第 21 天計算受精蛋的孵化率。結果顯示熱季之受精率與受精蛋孵化率分別為 A 組 50% (40/80) 與 95% (38/40)、B 組 20% (14/69)與 86% (12/14)；涼季之受精率與受精蛋孵化率分別為 A 組 90% (73/81)與 96% (70/73)；B 組 70%(53/76)與 92%(49/53) (表 1 與表 2)。

大部分哺乳動物的精液在經過冷凍解凍的過程中會有 40-50%的精子死亡，且授精率均會較新鮮精液低，家禽亦是如此。然而，在製作冷凍精液的過程中有幾個因素對解凍後的精液能否有理想的授精率是有密切的關聯，如稀釋液的種類、抗凍劑的種類、冷凍與解凍的速率與解凍後對有害物質(如甘油)的移除等 (Buss, 1993)。在抗凍劑方面一般常用的有甘油、DMA 與 DMSO 等，Tselutin *et al.* (1999) 指出以上三種常用的抗凍劑對雞精子毒性影響，以 DMSO 的毒性最大，DMA 次之，甘油較小，雖然甘油對精子毒性影響較小，但是甘油的存在會影響受精率，故解凍後要將其移除，在使用上有其不方便性。另外，冷凍精液製作的型態亦與其解凍後的授精率亦有關，如冷凍精液的製作型態為麥管式，則以甘油為抗凍劑，其解凍後的授精率為 50-60%，若以 DMA 為抗凍劑，其解凍後的授精率僅為 27%；如將同是以 DMA 為抗凍劑，冷凍精液的製作型態改為粒狀的形式，其解凍後的授精率可達 92.7% (Tselutin *et al.*, 1999)。本實驗的結果在涼季的授精率亦可達 90%與其相似。

台灣土雞自然配種的授精率可達 90%以上，但由於土雞的賴抱性強，為求有更好的產蛋率，一般都採籠飼管理，因此自然配種不易執行，故大部分是採人工授精方式配種，若以民間養雞場僱用專業的人工授精人員來執行此項工作，採用每三到四天授精一次，雖然他們技術純熟，但由於未經過專業訓練許多基本的精液處理常識不足，導致授精率只能維持在 60-70%之間；另外，台灣位處於亞熱帶區域，在這種環境下雞精液的品質雖沒有明顯的季節性 (鍾等, 1989)，但是台灣土雞人工授精的授精率冬季及春季均優於夏季 (劉等, 1993)。本實驗在涼熱兩季的授精率不管是 A 組或 B 組，均是涼季較熱季高。

根據本實驗連續三天授精 (A 組) 結果平均七天的授精率在涼季可達 90%，此結果與利用新鮮精液來作人工授精時的結果相近，但在第六天明顯的下降為 66%；在熱季平均七天的授精率下降到 50%。如僅授精一次 (B 組) 結果平均七天的授精率在涼季為 70%，但在熱季平均七天的授精率下降到 20%。因此，依據本試驗結果顯示以粒狀冷凍精液進行台灣土雞的種原保存是可行的，但建議以涼季來進行種原繁衍會有較好的授精率。

表 1. 涼、熱兩季急速冷凍之雞精子解凍後連續授精三天的受精率與受精蛋之孵化率

Table 1. Persistence of fertility and hatchability of cryopreserved fowl spermatozoa by continuous AI for three day in cool season and hot season

		Time of collected egg (day)							Total
		1	2	3	4	5	6	7	
Cool season (Jan.)	Egg No.	13	16	15	9	13	6	9	81
	Fertilized (%)	12/13 (92)	15/16 (94)	15/15 (100)	9/9 (100)	11/13 (85)	5/6 (83)	6/9 (66)	73/81 (90) ^a
	Hatchability (%)	92	100	93	100	91	100	100	96 ^a (70/73)
Hot Season (Jul.)	Egg No.	14	16	13	15	10	9	3	80
	Fertilized (%)	7/14 (50)	9/16 (56)	6/13 (46)	10/15 (66)	3/10 (30)	4/9 (44)	1/3 (33)	40/80 (50) ^b
	Hatchability (%)	85	100	100	90	100	100	100	95 ^a (38/40)

^{ab} Means within different seasons of total fertilized and total hatchability with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

表 2. 涼、熱兩季急速冷凍之雞精子解凍後僅授精一次的受精率與受精蛋之孵化率

Table 2. Persistence of fertility and hatchability of cryopreserved fowl spermatozoa by one AI of in cool and hot season

		Time of collected egg (day)							Total
		1	2	3	4	5	6	7	
Cool season (Jan.)	Egg No.	13	15	11	10	9	10	8	76
	Fertilized (%)	11/13 (85)	15/15 (100)	8/11 (73)	6/10 (60)	5/9 (56)	5/10 (50)	3/8 (38)	53/76 (70) ^a
	Hatchability (%)	100	100	100	83	60	80	100	92 ^a (49/53)
Hot season (Jul.)	Egg No.	12	11	7	12	8	9	10	69
	Fertilized (%)	6/12 (50)	3/11 (27)	2/7 (29)	3/12 (25)	0/8 (0)	0/9 (0)	0/10 (0)	14/69 (20) ^b
	Hatchability (%)	83	100	100	67	0	0	0	86 ^a (12/14)

^{ab} Means within different seasons of total fertilized and total hatchability with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

參考文獻

- 江惠湄、蔡經源、黃祥吉。1991。台灣土雞人工授精稀釋液之開發。中華農學會報 新 154：69~77。
- 陳志峰、李淵百、范揚廣。1994。台灣土雞種原保存。中畜會誌 23 (3)：339~346。
- 黃祥吉、洪哲明。2002。冷藏 6 或 24 小時對來亨雞、紐漢西與土雞授精率之影響。畜產研究 35 (1)：51~56。
- 劉瑞珍、鐘秀枝、陳若菁、黃祥吉。1993。土雞人工授精之研究(I)授精量對受精率之影響。畜產研究 26 (1)：25~33。
- 駱亞欣、劉振發、吳明哲。1995。螢光鏡檢活的、垂死的和死亡的豬精子。中畜會誌 (增刊) 24：71。
- 鍾秀枝、黃祥吉、戴謙。1989。各品系來亨公雞精液性狀與季節之關係。畜產研究 22 (1)：69~77。
- Buss, E. G. 1993. Cryopreservation of rooster sperm. Poult. Sci. 72:944~954.
- Chalah, T., F. Seigneurin, E. Blesbois and J. P. Brillard. 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. Cryobiology 39：185~191.
- Khovnir, O. A., B. I. Ivaov, I. I. Popov and B. K. Tur. 1985. The use of gamete freezing for preservation of fowl genetic resources. Referativnyi Zhurnal 7.58.522.
- Lake, P. E. 1986. The history and future of the cryopreservation of avian germ plasm. Poult. Sci. 65：1~5.
- Lake, P. E. 1957. Fowl semen as collected by the Massage method. J. Agric. Sci. 49：120~126.
- Sexton, T. J. 1981. Effect of prefreeze treatment on the fertilizing capacity of frozen chicken semen. Poult. Sci. 60：1552~1557.
- Tselutun, K., F. Seigneurin and E. Blesbois. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poult. Sci. 78：586~590.
- Watanabe, M., K. Ashizawa and T. Terada. 1975. A comparison of one and 15 minutes equilibration in the technique of preserving fowl spermatozoa at subzero temperatures. Brit. Poult. Sci. 16：535~539.
- Wishart, G. J. 1985. Quantification of the fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa. Brit. Poult. Sci. 26：375~380.

Survival rate and fertility of cryopreserved fowl spermatozoa and hatchability of the fertilized eggs⁽¹⁾

Jenn-Fa Liou⁽²⁾⁽⁵⁾, Ming-Che Wu⁽³⁾, Hsiao-Lung Liu⁽⁴⁾, Jui-Jane Liu Tai⁽²⁾
and Hsiang-Chi Huang⁽⁴⁾

Received Apr. 23, 2003 ; Accepted Jun. 6, 2003

Abstract

Cryopreservation of germ cells is an efficient method to preserve genetic resources. This study was conducted to develop a rapid freezing method to preserve the spermatozoa of Taiwan native chicken. Semen of five roosters from TLRI were collected and mixed, and then diluted with freezing medium containing 12% dimethylacetamide (DMA) on an equal volume basis. Diluted semen were then kept in 0°C ice bath for 10 minutes and then the diluted semen were made into droplet (20~25 µl per drop) and put directly in liquid nitrogen. The semen pellets were packed in 1 freezing vial per 12-15 pellets for the storage in liquid nitrogen. Freezing medium was made from a base medium of commercial pig semen extender (Sperm-Up solution) with 12% DMA. Semen was collected, frozen in hot and cool season, respectively. Thawing the semen pellets was performed with 0.4 ml Sperm-Up solution pre-heat to 60°C per vial, and then kept the vial on 0°C ice bath till insemination. Insemination was performed 30 hens of group A for three consecutive days or in 30 hens of group B for a single insemination. Egg was collected from 1st until 7th day after insemination. The survival rate of fowl spermatozoa varied from 45 to 50% in this study. Fertilities were 50% (group A) and 20% (group B) in hot season, and those of cool season were 90% (group A) and 70% (group B), respectively. Hatchabilities were 95% (group A) and 86% (group B) respectively in hot season, and those of cool season were 96% (group A) and 72% (group B), respectively.

Key words : Fowl spermatozoa, Cryopreservation, Survival rate, Fertility, Hatchability.

-
- (1) Contribution No.1193 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.
 - (2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua 712, Tainan, Taiwan, R.O.C.
 - (3) Hsinchu Branch, COA-LRI, Hsinchu 300, Taiwan, R.O.C.
 - (4) Animal Industry Division, COA-LRI, Hsinhua 712, Tainan, Taiwan, R.O.C.
 - (5) Corresponding author.