

熱季下水牛冷凍精液製程對解凍後品質之影響⁽¹⁾

魏良原⁽²⁾⁽⁵⁾ 劉炳燦⁽⁴⁾ 賈玉祥⁽³⁾

收件日期：94 年 12 月 1 日；接受日期：95 年 8 月 26 日

摘要

本試驗於熱季（2004 年 8~9 月）進行，探討不同稀釋液、稀釋方法與平衡時間對水牛冷凍精液解凍後，於 37°C 培養 0 和 3 小時，對其精子活動力與經由精子低滲透壓膨脹試驗所測試之精子膜功能完整性之影響。試驗結果顯示，將稀釋液先以不含甘油之稀釋液稀釋，再於 30°C 添加含甘油之稀釋液時，對精液冷凍—解凍後，於 37°C 培養 0 小時後，其精子活動力與精子膜功能完整性之結果，皆極顯著高於一段添加者（分別為 $57.2 \pm 3.4\%$ vs. $51.3 \pm 5.5\%$ 及 $48.9 \pm 3.4\%$ vs. $43.8 \pm 3.2\%$, $P < 0.01$ ）；培養 3 小時後，亦以兩段添加之精子膜功能完整性結果顯著高於一段添加者（ $28.0 \pm 2.3\%$ vs. $25 \pm 3.4\%$, $P < 0.05$ ）。水牛精液於裝填降溫後，於 5°C 經 2 小時平衡時間處理，比 0 小時者，可顯著改善於 37°C 培養 0 小時（ $50.7 \pm 4.9\%$ to $57.9 \pm 2.9\%$, $P < 0.01$ ）及 3 小時（ $24.7 \pm 2.6\%$ to $26.4 \pm 1.6\%$, $P < 0.05$ ）之精子活動力；亦顯著改善解凍後經培養 0 小時（ $44.9 \pm 3.4\%$ to $47.9 \pm 4.3\%$, $P < 0.05$ ）及 3 小時（ $25.5 \pm 2.9\%$ to $28.2 \pm 2.7\%$, $P < 0.05$ ）之精子膜的功能完整性。比較三羥基甲基氨基甲烷及乳糖為基質的兩種不同稀釋液處理的效果時，精液經解凍後，於 37°C 培養 0 及 3 小時之精子活動力與精子膜功能完整性之評估皆無顯著差異，顯示兩種稀釋液皆可應用於台灣水牛冷凍精液。由本試驗結果得知於製作台灣水牛冷凍精液時，可於 30°C 下，將精液先以不含甘油之稀釋液稀釋，再添加含甘油稀釋液後，進行裝填與封口，緩慢降溫至 5°C 後，經 2 小時的平衡時間，再進行冷凍過程，可得較佳之冷凍—解凍後，於 37°C 培養 0 和 3 小時之精子活動力與低滲透壓膨脹試驗所測試之精子膜功能的完整性，而其冷凍精液解凍後的人工授精授胎率為 50%（9/18）。

關鍵詞：台灣水牛、冷凍精液、低滲透壓膨脹試驗。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1334 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所彰化種畜繁殖場。

(4) 國立屏東科技大學畜產系。

(5) 通訊作者：E-mail: lywei@mail.tlri.gov.tw

緒言

新鮮精液品質與冷凍精液製程皆會影響精液冷凍的效果。一般而言，異常型態率低於 20%，精子活動力需高於 70% 的新鮮精液才用以製作冷凍精液 (Ax *et al.*, 2000)；在台灣水牛精液性狀的季節性調查中，雖以熱季下的精子活動力較低，死精子率較高 (魏等, 2005)，惟各性狀仍優於上述標準，為確認於熱季的環境下所製成的冷凍精液之可用性，故於熱季進行樣品採集。水牛冷凍精液的製程大致可分為：一、於室溫下直接進行稀釋至所需的精子濃度，將稀釋後精液予以裝填於麥管並封口，經降溫至 4~5°C 後，進行冷凍程序的一段式稀釋。二、於室溫進行第一次稀釋至所需濃度的二倍，經降溫至 4~5°C 後，再進行第二次稀釋至所需濃度，並於 4~5°C 環境下裝填與封口，然後進行冷凍程序的二段式稀釋等兩種方式。此二稀釋方式皆可應用於冷凍精液製作上，且以一段式稀釋的方式，無須控制低溫條件的低溫庫，具有設備較簡單，及操作人員可於室溫的環境下進行精液稀釋裝填的優點 (Thun *et al.*, 2002)。因此，本試驗以 30°C 下稀釋、裝填、封口的一段式稀釋方法，將水牛新鮮精液以不同稀釋液配方、稀釋液直接添加或分為含與不含甘油兩部分分段添加與不同平衡時間等處理，探討各種處理對冷凍精液品質的影響，以建立適當之台灣水牛冷凍精液製作流程。冷凍—解凍後的精液以精子活動力和低滲透壓膨脹試驗 (hypo-osmotic swelling test, HOST; Pratap *et al.*, 2000) 所代表的精子膜功能完整性等兩種檢測項目，評估精液之品質。並以檢測所得結果的最佳處理組合的製作方式，進行冷凍精液製作，於冷凍保存 30 日後施以人工授精。

材料與方法

I. 試驗動物與飼養管理

試驗於 2004 年 8~9 月進行，以假陰道採集 3 頭 5 歲以上之台灣水牛精液供試。試驗牛隻圈飼於無水浴設備之個別牛欄 (5 × 5 m)，於牛欄角落上方提供滴水設施供其散熱，飲水、礦鹽與盤固乾草任食，每日並補充肉牛精料 2 kg (上午 08 : 00 及下午 15 : 00 各 1 kg)。

II. 精液稀釋液配製

(I) 三經基甲基氨基甲烷—檸檬酸—蛋黃—果糖—甘油 (TCYG) 稀釋液

稀釋液的調配乃依 Rasul *et al.* (2000) 所述，將三經基甲基氨基甲烷 (Tris- (hydroxymethyl) -aminomethane, Tris) 7.87 g 與檸檬酸 12.50 g，分別溶解於蒸餾水 200 mL 中，再以 Tris 溶液滴定檸檬酸溶液至混合液達 pH 7.0 後，以蛋黃 20% (v/v)、果糖 0.2% (w/v)、甘油 6% 的比率調製稀釋液；將上述混合液，再添加 penicillin (1000 IU/mL) 及 streptomycin (100 μ g/mL)，供一段添加用。再依上述操作方式，調配合甘油 0 及 12% (v/v) 等二種不同甘油濃度的稀釋液，供二段添加用。各種不同甘油濃度的稀釋液，均以 12,000 × g 離心 15 分鐘，取懸浮液，置於 -20°C 保存，試驗前置於 30°C 水浴槽回溫。

(II) 乳糖—蛋黃—甘油 (LYG) 稀釋液

稀釋液配方中，含乳糖 11% 的溶液、蛋黃及甘油含量分別為 75.3%、20% 及 4.7% (v/v) (李等, 1986)，供一段添加用。另將該配方依不同甘油含量調整成，含乳糖 11% 的溶液 80%、蛋黃 20%、甘油 0%，與乳糖 11% 的溶液 70.6%、蛋黃 20%、甘油 9.4%，供二段添加用。各種稀釋液均分別添加 penicillin (1000 IU/mL) 及 streptomycin (100 μ g/mL)。各稀釋液均於採樣前一天配製，置於 4°C 冷藏，試驗前取懸浮液，置於 30°C 水浴槽回溫。

III. 精液採集與處理

試驗為期四週，每週採精 1 次，合計採集公水牛之 12 次射精樣品。採集的精液，經精子活動力檢查超過 70% 者方用於試驗。每週採樣後將 3 頭水牛的精液混合，均分成 4 等份，置於水浴槽（30℃）中，其中二等份，分別以含 6% 甘油之 TCYG 與 4.7% 甘油之 LYG 稀釋液緩慢稀釋 10 倍（稀釋液一段添加）。另二等份，先以不含甘油的 TCYG、LYG 稀釋液緩慢稀釋 5 倍，維持於 30℃，10 分鐘後，再分別以含 12% 甘油之 TCYG 與 9.4% 甘油之 LYG 稀釋液緩慢稀釋至原精液之 10 倍（稀釋液分兩段添加）。將 4 種不同處理的稀釋後精液，於室溫下分別裝填於 4 種標示不同顏色之 0.5 mL 精液麥管（每種處理各 12 支，共 48 支麥管），分別以夾鏈袋包裝後，置入含清水的容器，於 -20℃ 環境下慢速降溫至 5℃（30 to -5℃/2 hr）（Dhami and Sahni, 1993），再將各不同顏色的麥管，置於 5℃ 平衡 0 或 2 小時（各 6 支麥管）。最後將所有處理樣品以液態氮蒸氣於 -120℃ 維持 10 分鐘後，投入液態氮中保存（Sukhato *et al.*, 2001），操作流程如圖 1。精液於液態氮中約 24 小時後，以 37℃，30 秒解凍，並評估培養於 37℃，0 及 3 小時的精子活動力及低滲透壓膨脹試驗（hypo-osmotic swelling test, HOST）反應的結果。

IV. 精液品質評估

（I）精子活動力

每樣品二重複，以生理食鹽水稀釋原精液 200 倍後，將血球計數板置於 37℃ 的加溫板上，如計算精液濃度之方法，在血球計數板上計算 5 個方格內不泳動的精子數（A），再將原精液以 3% NaCl 稀釋後，計算精液濃度所得的值為（B），則 $(B-A)/B \times 100\%$ 即為精子活動力（姜，1977）。

（II）低滲透壓膨脹試驗（HOST）

低滲透壓膨脹試驗所需之低滲透壓溶液乃仿 Pratap *et al.*（2000）的方式，取果糖 13.51 g 與檸檬酸鹽 7.35 g 溶解於蒸餾水 1 L，將冷凍—解凍後的精液取 0.1 mL 與 1 mL 的低滲透壓溶液混合，於 37℃ 培養 60 分鐘後，取一小滴，置於 400 × 顯微鏡下檢查 5 個視野至少 200 個精子的低滲透壓膨脹試驗之反應（Revel *et al.*, 1994）。對低滲透壓膨脹試驗檢測具有反應的精子，代表精子膜具功能性，其精子型態上之變化依 Correa *et al.*（1997）所描述。

V. 試驗設計與統計分析

本試驗的設計為 2³ 複因子試驗，共 3 種處理，分別為不同稀釋液（TCYG 或 LYG）、稀釋方法（含甘油稀釋液分一或兩段添加）及平衡時間（0 或 2 小時）等三種因子，各處理含兩個因子，共 8 種處理因子組合，每個處理因子重複 6 次，上述所有處理因子組合，設計重複四次，並分別於試驗期間的 4 個週次採集精液樣品以進行試驗。各試驗處理組所得之冷凍精液，解凍後培養於 37℃，0 及 3 小時的精子活動力及低滲透壓膨脹試驗檢測結果的數據，以隨機複因子區集設計，其觀測值數學模式如下：

$$Y_{ijklm} = \mu + R_i + D_j + M_k + E_m + DM_{jk} + DE_{jm} + ME_{km} + DME_{jkm} + e_{ijklm}$$

Y = 試驗數據觀測值。

μ = 試驗數據之平均值。

R_i = 重複次數（ $n = 1, 2, 3, 4$ ）。

D_j = 稀釋液處理效應（ $j = 1, 2$ ）。

M_k = 稀釋方法處理效應（ $k = 1, 2$ ）。

E_m = 平衡時間處理效應（ $m = 1, 2$ ）。

DM_{jk} , DE_{jm} , ME_{km} 二因子間의 交互效應。

DME_{jkm} 三個因子間의 交互效應。

e_{ijklm} = 機差。

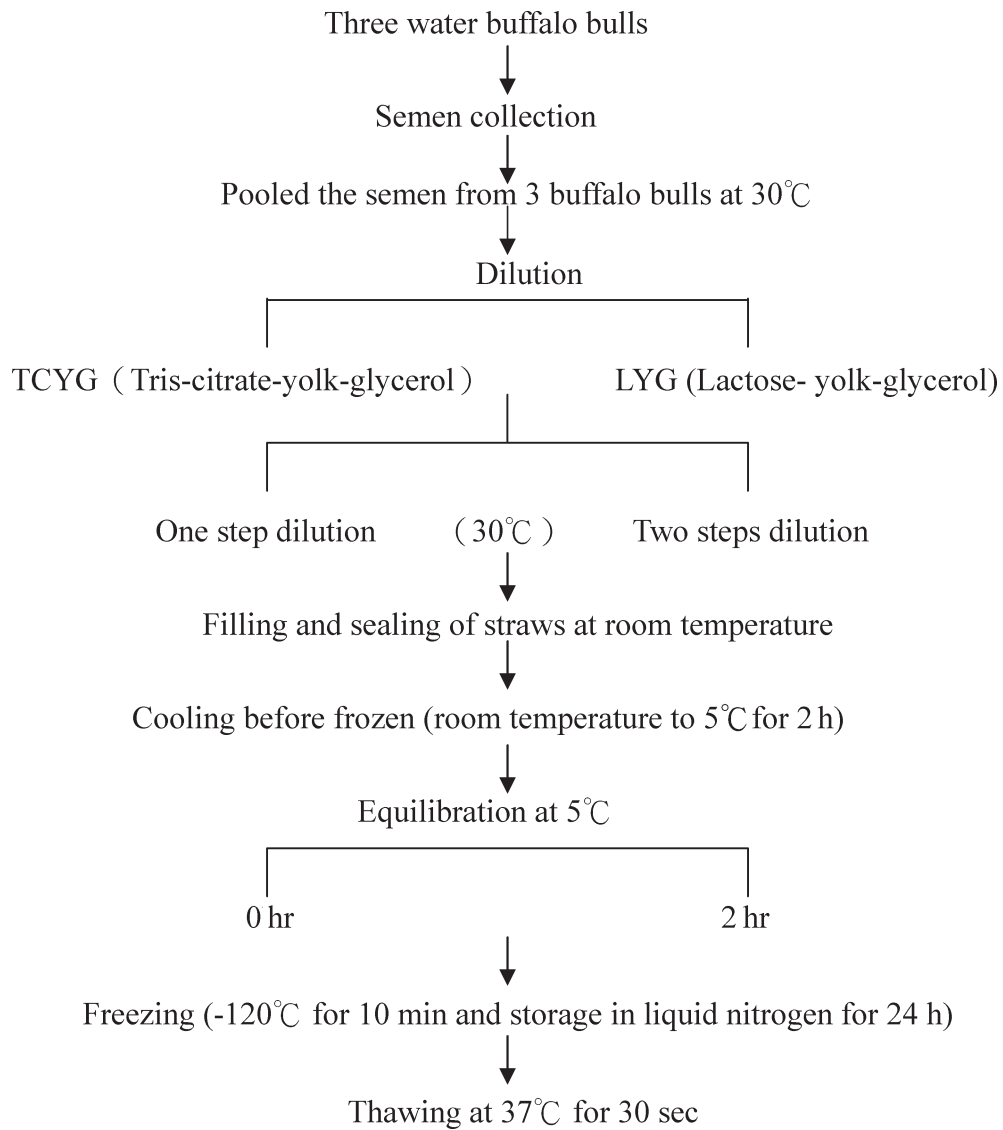


圖 1. 冷凍精液製作與試驗處理流程。

Fig. 1. Flow chart of the procedures for semen freezing and treatments.

結果與討論

新鮮之水牛精液以不同稀釋液、稀釋方法與平衡時間進行處理，其結果顯示，水牛精液保存於液態氮 24 小時後，於 37°C 解凍並培養 0 小時及 3 小時後的精子活動力及低滲透壓膨脹試驗結果如表 1。新鮮精液經冷凍—解凍，並於 37°C 培養 0 小時及 3 小時後，兩種檢測值皆極顯著 ($P < 0.01$) 下降，其中精子活動力自新鮮精液之 $81.3 \pm 5.0\%$ 分別降至 $54.3 \pm 5.4\%$ 及 $25.5 \pm 2.3\%$ ，亦即冷凍精液製作過程共減少約 33.2% 的精子活動力（減少的精子活動力／原精子活動力），於 37°C 培養 3 小時的過程約減少 35.4%。以低滲透壓膨脹試驗檢測精子膜功能性的結果顯示，冷凍—解凍後的精液，經 37°C 培養 0 及 3 小時，精子膜具功能性的百分率自新鮮精液之 $72.6 \pm 6.9\%$ 分別降至 $46.4 \pm 4.1\%$ 及 $26.8 \pm 3.1\%$ ，顯示膜具功能性的精子百分率，於冷凍精液製作過程共失去 36.1%（失去膜功能的精子率／原具有膜功能性的精子率），於 37°C 培養 3 小時的過程約失去 27.0%。冷凍精液製作過程對精子之傷害性，已被多所報導（Sukhato *et al.*, 2001; Karmur *et al.*, 2002; Herold *et al.*, 2004），而整個製作過程使精子活動力減少約 30~35%，其中稀釋與平衡的過程，佔 5~7%，而冷凍—解凍過程約佔 25~29%（Dhami *et al.*, 1994），同時亦使得 25% 的精子失去膜功能性（Pratap *et al.*, 2000）。

I. 稀釋液對冷凍精液品質之影響

以 TYCG 及 LYG 兩種不同稀釋液配方製成之冷凍精液，於 37°C 解凍並培養 0 及 3 小時後，其精子活動力皆無顯著差異（分別為 $53.9 \pm 5.0\%$ vs. $54.7 \pm 5.9\%$ 及 $25.1 \pm 2.7\%$ vs. $25.9 \pm 1.8\%$ ）。而低滲透壓膨脹試驗反應亦然（ $46.1 \pm 3.8\%$ vs. $46.6 \pm 4.6\%$ 及 $26.8 \pm 3.0\%$ vs. $26.9 \pm 3.3\%$ ）（如表 1）。

試驗結果顯示，含 TYCG 及 LYG 兩種不同稀釋液配方，應用於台灣水牛冷凍精液製作時，其解凍後與解凍後經培養之精子活動力及低滲透壓膨脹試驗反應相似。Iqba *et al.*（1987）與 Kumar *et al.*（1992）的研究報告亦指出，以 Tris 及乳糖兩者為基質的稀釋液，其解凍後的精子活動力無顯著差異。Akhtar *et al.*（1990）以酶於冷凍—解凍後之逸出，當作水牛精子膜結構完整的指標時，其結果亦顯示，Tris 及乳糖為基質的稀釋液，其抗凍效果相同。然而，Dhami and Kodagali（1990）的研究報告指出，以 Tris 為基質的稀釋液，所製成的 Suti 水牛冷凍精液，其受胎率高於以乳糖為基質者（分別為 42.7% 及 37.5%）。李等（1986）的報告則指出，以乳糖為基質的台灣水牛精液稀釋液，其解凍後之精子活動力（ $52.2 \pm 11.4\%$ vs. $43.0 \pm 12.2\%$ ）、頭巾完整性（86% vs. 70%）、於 37°C 培養 4 小時後的活動力（ $38.8 \pm 15.2\%$ vs. $10.0 \pm 5.3\%$ ）及人工授精受胎率（69.3% vs. 38.5%），皆高於以 Tris 為基質者。造成差異的原因除飼養管理條件、氣候與品種差異外，可能因不同研究中所使用的稀釋液配方組成亦有所差異所致。

II. 稀釋方法對冷凍精液品質之影響

含甘油的精液稀釋液直接添加或分為含與不含甘油兩部份分段添加等兩種處理之精液，於解凍後於 37°C 培養 0 小時，以兩段添加之精子活動力，極顯著高於一段添加者（ $57.2 \pm 3.4\%$ vs. $51.3 \pm 5.5\%$, $P < 0.01$ ）；培養 3 小時後，一段與兩段添加組之差異不顯著（ $25.0 \pm 1.9\%$ vs. $26.0 \pm 2.6\%$ ）。以低滲透壓膨脹試驗評估精子膜之功能完整性結果，不論解凍後於 37°C 培養 0 或 3 小時，則均以兩段添加稀釋液者，顯著高於一段添加者（分別為 $48.9 \pm 3.4\%$ vs. $43.8 \pm 3.2\%$, $P < 0.01$ ，與 $28.0 \pm 2.3\%$ vs. $25.7 \pm 3.4\%$, $P < 0.05$ ）（如表 1）。上述結果顯示，將水牛精液稀釋液分為含與不含甘油兩個部份，先添加不含甘油的稀釋液，再添加含甘油者之兩段添加稀釋液方式，可得較佳之解凍後於 37°C 培養 0 及 3 小時的精液品質。

冷凍保存的精子於製作過程中，對滲透壓的變化相當敏感 (Fiser and Fairfull, 1984)，且滲透壓突然改變，會造成滲透壓性休克，導致精子存活率降低與膜的損傷 (Correa and Zavos, 1995)，因此，添加稀釋液時需緩慢添加，以減少精子發生滲透壓性休克。而稀釋液中的甘油會與細胞膜上的磷脂質結合，使得細胞質膜的流動性降低 (Anchordoguy *et al.*, 1987)，也可能導致微管結構改變 (Keates, 1980)，進而影響細胞質膜訊息傳遞甚至破壞細胞質膜，使冷凍—解凍後的精液品質下降，減低精子的授精能力 (Fiser and Fairfull, 1984)，且不論添加含甘油的稀釋液或添加後再移除稀釋液中甘油，皆會使精子所處溶液中的滲透壓產生很大的變化 (Katkov *et al.*, 1998)，此種甘油導致的滲透壓變化對細胞的傷害，更甚於其本身之化學毒性 (chemical toxicity) (Correa and Zavos, 1995)。據 Correa and Zavos (1995) 的報告，將解凍後的牛精液，以分別含 0% 及 7% 甘油的 Ham's F-10 溶液稀釋，雖然於 37°C 開始培養前 (0 小時) 其精子的活動力不因稀釋液是否含甘油而有顯著差異，但隨著於 37°C 下培養的時間增加 (60、120 分鐘)，含 0% 甘油組較 7% 甘油組，顯著 ($P < 0.05$) 具有較高的精子活動力。而以低滲透壓膨脹試驗檢測於 37°C 培養 0、60、120 分鐘之精子膜的功能性時，不同時間所測之結果，皆以含 0% 甘油組顯著 ($P < 0.05$) 優於含 7% 甘油組。顯示稀釋溶液中含甘油時，對精子活動力、膜的功能性及於 37°C 經不同時間培養所代表之抗熱能力 (thermo-resistance) 皆有不利益之影響，雖然於剛稀釋時精子的活動力尚未被檢測出已減低，而經由其膜的功能完整性檢測時，則可察覺傷害於稀釋時已然發生。

本試驗的 TCYG 和 LYG 兩組稀釋液中，當稀釋液分成含與不含甘油二部份，將含甘油的稀釋液於第二段才添加時，第一段不含甘油的稀釋液已將原精液稀釋，並增加整個稀釋後精液的容積，相對可能減緩第二段含甘油稀釋液造成的滲透壓性休克，使得稀釋液分為含與不含甘油兩部分分段添加的方式製作的冷凍精液，有較佳的解凍後精子活動力與經 37°C 培養 0 及 3 小時之低滲透壓膨脹試驗檢測所代表之精子膜功能完整性等品質性狀。

III. 平衡時間對冷凍精液品質之影響

水牛精液於冷凍前以 2 小時的平衡時間處理者，於解凍後以 37°C 培養 0 小時，其精子活動力極顯著高於平衡 0 小時者 ($57.9 \pm 2.9\%$ vs. $50.7 \pm 4.9\%$, $P < 0.01$)；經 37°C 培養 3 小時後，亦以平衡 2 小時者顯著高於平衡 0 小時者 ($26.4 \pm 1.6\%$ vs. $24.7 \pm 2.6\%$, $P < 0.05$)。在低滲透壓膨脹試驗之反應方面，比較冷凍前平衡 2 及 0 小時的處理時，則不論於 37°C 經培養 0 小時及 3 小時，皆以經 2 小時平衡時間之處理組，顯著高於 0 小時平衡者 (分別為 $47.9 \pm 4.3\%$ vs. $44.9 \pm 3.4\%$ 及 $28.2 \pm 2.7\%$ vs. $25.5 \pm 2.9\%$, $P < 0.05$ ；如表 1)。

上述結果顯示，水牛精液於室溫裝填，經 2 小時慢速降溫至 5°C 後，仍需於 5°C 下平衡 2 小時，方可得較佳之解凍後經 37°C 培養 0 及 3 小時之精子活動力與精子膜功能的完整性，此結果與 Tuli *et al.* (1981)、Dahmi and Sahni (1993) 及 Dahmi and Sahni (1994) 的報告一致。雖然早期有研究報告認為以 2 小時，自 30°C 降到 5°C 的降溫速率，並維持 8~9 小時平衡時間，可使冷凍—解凍後精液具有較佳之精子活動力及頭巾完整性 (Jondet *et al.*, 1972)，惟 Tuli *et al.* (1981) 建議平衡時間不應超過 7 小時。Dhami and Kodagali (1990) 建議平衡時間約 6 小時；Dhami and Sahni (1994) 則建議約 2~4 小時。Herold *et al.* (2004) 指出，自非洲水牛之附睪取出精子進行稀釋，其稀釋後到冷凍前的平衡時間若低於 4 小時，則解凍後的活力較差，而降溫過程之起始溫度以 30°C 優於 10°C。因此，稀釋後的水牛精液於 5°C 下的平衡時間，一般以不低於 2 小時而不多於 6 小時為原則。Sansone *et al.* (2000) 則建議若採兩段式稀釋的方式，需較長的平衡時間 (4~6 h)，採一段式於室溫進行稀釋、裝填、封口的步驟者，平衡時間較短 (2~4 h)。據 Dhami *et al.* (1992) 的報告指出，冷凍前於 5°C 經 1 或 2 小時的平衡，顯著 ($P < 0.05$) 比平衡 0 或 3 小時者，有較佳的冷凍—解凍後於 37°C 培養 0、30、60、120 分鐘的精子活動力。Dhami *et al.* (1996)，比較 806 頭水牛人工授精的結果亦

指出，採一段式稀釋於室溫進行稀釋、裝填、封口的步驟之時，冷凍前經 2 小時的平衡，其受精率極顯著 ($P < 0.01$) 高於 0 小時 (71.0% vs. 56.6%)。因此，水牛冷凍精液製作過程中，於冷凍前應給予 2 小時的平衡時間。

表 1. 不同稀釋液、稀釋方法及平衡時間對解凍後經培養於 37°C，0 及 3 小時後精子活動力與低滲透壓膨脹試驗反應之影響

Table 1. Effects of diluents, methods of dilution and equilibration periods on motility and HOST response of post-thaw buffalo spermatozoa incubated at 37°C for 0 and 3 hours

Treatments	Level	0 h		3 h	
		Motility, %	HOST, %	Motility, %	HOST, %
Methods of dilution	One step	51.3±5.5 ^a	43.8±3.2 ^a	25.0±1.9	25.7±3.4 ^x
	Two steps	57.2±3.4 ^b	48.9±3.4 ^b	26.0±2.6	28.0±2.3 ^y
Equilibration time (hr)	0	50.7±4.9 ^a	44.9±3.4 ^x	24.7±2.6 ^x	25.5±2.9 ^x
	2	57.9±2.9 ^b	47.9±4.3 ^y	26.4±1.6 ^y	28.2±2.7 ^y
Diluents	TCYG	53.9±5.0	46.1±3.8	25.1±2.7	26.8±3.0
	LYG	54.7±5.9	46.6±4.6	25.9±1.8	26.9±3.3

^{a, b}: Means with different superscripts within same column are highly significantly different ($P < 0.01$).

^{x, y}: Means with different superscripts within same column are significantly different ($P < 0.05$).

HOST: hypo-osmotic swelling test.

TCYG: Tris-citrate acid-egg yolk-fructose-glycerol.

LYG: Lactose-egg yolk-glycerol.

結論與建議

當採一段式稀釋法於室溫稀釋、裝填、封口的方式製作水牛冷凍精液時，應將稀釋液分為含與不含甘油兩個部分，先添加不含甘油的稀釋液，再添加含甘油者，緩慢攪拌，以一定的速率降至 5 °C，經 2 小時的平衡時間，再進行冷凍過程，可得較佳之冷凍—解凍後，於 37°C 培養 0 和 3 小時之精子活動力與低滲透壓膨脹試驗所測試之精子膜功能的完整性。

致謝

本試驗承本場劉東原、曾賢二先生及盧春鳳小姐的協助，方使試驗得以順利完成，謹此致謝。

參考文獻

- 李善男、曾青雲、林慶雄。1986。不同稀釋液及處理方法對水牛冷凍精液受胎率之比較研究。畜產研究 19 (1)：23-29。
- 姜延年。1977。台灣本土山羊精液性狀之季節性變化。碩士論文，國立台灣大學，台北市。
- 魏良原、劉炳燦、賈玉祥。2005。台灣水牛精液性狀之季節性變化。畜產研究 38 (4)：293-303。
- Akhtar, T., R. A. Chaudhry, I. H. Khan and T. M. Khan. 1990. Extracellular release of hyaluronidase and acrosin from buffalo bull spermatozoa extended in different extenders. Recent Adv. Buffalo Res. 3: 75-79.
- Anchordoguy, T. J., A. S. Rudoiph, J. F. Carpenter and J. H. Crowe. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. Cryobiology 34: 324-331.
- Ax, R. L., M. Dally, B. A. Didion, R. W. Lenz, C. C. Love, D. D. Varner, B. Hafez and M. E. Bellin. 2000. Semen evaluation. pp.365-375. In: Hafez, E. S. E. and B. Hafez (eds.) Reproduction in Farm Animals. Lippincott Williams & Willkins, South Carolina, USA.
- Correa, J. R. and P. M. Zavos. 1995. Frozen-thawed bovine spermatozoa diluted by slow or rapid dilution method: measurements on occurrence of osmotic shock and sperm viability. Theriogenology 44: 963-971.
- Correa, J. R., M. M. Pace and P. M. Zavos. 1997. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional test and fertility of bulls in an artificial insemination program. Theriogenology 48: 721-731.
- Dhami, A. J. and S. B. Kodagali. 1990. Freezability, enzyme leakage and fertility of buffalo spermatozoa in relation to the quality of semen ejaculates and extenders. Theriogenology 34(5): 853-863.
- Dhami, A. J., K. L. Sahni and G. Mohan. 1992. Effect of various cooling rate (from 30°C to 5°C) and thawing temperatures on deep freezing of Bos Taurus and Bos Indicus semen. Theriogenology 38: 565-574.
- Dhami, A. J. and K. L. Sahni. 1993. Evaluation of different cooling rates, equilibration periods and diluents for effects on deep freezing, enzyme leakage and fertility of Taurine bull spermatozoa. Theriogenology 40: 1269-1280.
- Dhami, A. J., V. R. Jani, G. Mohan and K. L. Sahni. 1994. Effect of extenders and additives on freezability, post-thaw thermoresistance and fertility of frozen Murrah buffalo semen under tropical climate. Buffalo J. 10(1): 35-45.
- Dhami, A. J. and K. L. Sahni. 1994. Effects of various cooling (from 30 to 5), equilibration and diluent treatments on freezability, post-thaw thermoresistance, enzyme leakage and fertility of bubaline spermatozoa. Buffalo J. 10(2): 147-159.
- Dhami, A. J., K. L. Sahni, G. Mohan and V. R. Jani. 1996. Effects of different variables on the freezability post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. Theriogenology 46: 109-120.

- Fiser, P. S. and R. W. Fairfull. 1984. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology* 21: 542-551.
- Herold, F. C., K. De Haas, D. Cooper, B. Colenbrander, J. Q. Nothing, W. Theunissen, B. Spillings and D. Gerber. 2004. Comparison of three different media for freezing of epididymal sperm from the Africa buffalo (*Syncerus caffer*) and influence of equilibration time on the post-thaw sperm quality. *J. Vet. Res.* 71(3): 203-210.
- Iqba, N, I. H. Khan, M. Anzar and R. A. Choudhary. 1987. Effect of extenders on the extracellular release of transaminase from deep frozen buffalo spermatozoa. *Buffalo J.* 3(1): 57-66.
- Jondet, R., Y. Rabadeux and M. Jondet. 1972. Effect of duration of chilling (from 30 to 5°C) on the recovery rate and fertility ability of frozen bull spermatozoa. *Anim. Breed Abstr.* 43: 77.
- Karmur, S. D., C. M. Rana, A. J. Dhami and G. V. Panchani. 2002. Hypo-osmotic swelling test in relation to motility of fresh and frozen-thawed Murrah buffalo semen. *Indian J. Dairy Sci.* 55(6): 363-365.
- Katkov, I. I., N. Katkova, J. K. Crister and P. Mazur. 1998. Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology* 37: 325-338.
- Keates, R. A. B. 1980. Effect of glycerol on microtubule polymerization kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 97: 1163-1169.
- Kumar, S., K. L. Sahin and G. Mohan. 1992. Effect of different levels of glycerol and yolk on freezing and storage of buffalo semen in milk, Tris and sodium citrate buffers. *Buffalo J.* 8(2): 151-156.
- Pratap, N., V. N. V. Reddy, P. A. Sarma and T. G. Honnappa. 2000. Employment of the hypoosmotic swelling test (HOST) to evaluate sperm membrane integrity of fresh and frozen buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Buffalo J.* 16(2): 207-213.
- Rasul, Z., M. Anzar, S. Jalali and N. Ahmad. 2000. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics, plasma membrane integrity, and acrosome morphology of buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 59: 31-41.
- Revel, S. G. and R. A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36: 77-86.
- Sansone, G., M. J. F. Natri and A. Fabbrocini. 2000. Storage of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 55-76.
- Sukhato, P., S. Thongsodseang, A. Utha and N. Songsasen. 2001. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 67: 69-77.
- Thun, R., M. Hurtado and F. Janett. 2002. Comparison of Biociphos-Plus[®] and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology* 57(3): 1087-1094.
- Tuli, R. K., M. Singh and J. S. Mathroo. 1981. Effect of equilibration times and extenders on deep freezing of buffalo semen. *Theriogenology* 16: 99-104.

The effects of various procedures for cryopreservation of spermatozoa in water buffalo in hot season ⁽¹⁾

Liang-Yuan Wei ^{(2) (5)}, Bing-Tsan Liu ⁽⁴⁾ and Yu-Shine Jea ⁽³⁾

Received : Dec. 1, 2005 ; Accepted : Aug. 26, 2006

Abstract

The process of preparing frozen semen significantly affects the quality of frozen-thawed semen. The objective of this experiment was to study the effects of various diluents (TYCG and LYG), methods of dilution (one-step and two-step) and equilibration periods (0 and 2 h) on the post-thawed motility and hypo-osmotic swelling test (HOST) response of spermatozoa and the indication of the functional integrity of sperm membrane of buffalo spermatozoa after incubated at 37°C for 0 and 3 hours. Results showed that both motility and HOST response of post-thawed semen of one-step dilution after being incubated at 37°C for 0 hr were significantly higher than that of one-step (57.2 ± 3.4 vs. 51.3 ± 5.5% and 48.9 ± 3.4 vs. 43.8 ± 3.2%, respectively; $P < 0.01$). The HOST response was also significantly higher in the two-step dilution method than one-step after incubating at 37°C for 3 hours (28.0 ± 2.3 vs. 25.7 ± 3.4%, $P < 0.05$). After filling, sealing and cooling to 5°C of straws, semen with equilibration at 5°C for 2 hours significantly showed a better motility than semen with the 0 hour equilibration, after incubating the frozen-thawed semen at 37°C for 0 hour (50.7 ± 4.9 to 57.9 ± 2.9%, $P < 0.01$) and 3 hours (24.7 ± 2.6 to 26.4 ± 1.6%, $P < 0.05$). The semen with 2-hour equilibration at 5°C also significantly showed improvement on the HOST response than 0 hour equilibration, after incubating at 37°C for 0 hour (44.9 ± 3.4 to 47.9 ± 4.3%, $P < 0.05$) and 3 hours (25.5 ± 2.9 to 28.2 ± 2.7%, $P < 0.05$). Comparing the effects of TYCG and LYG diluents, we found there was no significant difference in motility or HOST response between two diluents after incubating the frozen-thawed semen at 37°C for 0 and 3 hours. Overall, the procedures of diluting, filling, sealing at 30°C, diluting in two steps and equilibrating at 5°C for 2 hours for buffalo spermatozoa cryopreservation were essential for producing better results in motility and HOST response of post-thaw buffalo spermatozoa after incubating at 37°C for 0 and 3 hour, and the conception rate was 50% (9/18).

Key words : Taiwan water buffalo, Frozen semen, Hypo-osmotic swelling test

(1) Contribution No. 1334 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hualien Animal Propagation Station, COA-LRI, Hualien, Taiwan, R.O.C.

(3) Changhua Animal Propagation Station, COA-LRI, Changhua, Taiwan, R.O.C.

(4) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, R.O.C.

(5) Corresponding author. E-mail: lywei@mail.tlri.gov.tw