

山羊冷凍精液稀釋液添加甘油與海藻糖對精子的影響⁽¹⁾

章嘉潔⁽²⁾⁽⁴⁾ 吳昇陽⁽²⁾ 沈朋志⁽³⁾

收件日期：97年10月16日；接受日期：98年2月23日

摘要

本試驗探討添加甘油 (glycerol) 與海藻糖 (trehalose) 於冷凍稀釋液對山羊冷凍精液解凍後品質的影響。採用 6 頭成熟阿爾拜因公羊，以假陰道法採取新鮮精液，並分別以 Tris- 葡萄糖-檸檬酸-蛋黃 (Tris-glucose-citric acid-yolk; TCG) 之精液稀釋液稀釋，稀釋最終濃度為 5×10^8 cell/mL。試驗一、比較 TCG 精液稀釋液添加不同濃度甘油，評估解凍後的精子存活率、精子活力及精子頭帽完整性之差異。試驗結果顯示，在 TCG 稀釋液添加 4% 及 7% 甘油濃度，對於精子活力、存活率及精子頭帽完整性，在統計上均無顯著差異。試驗二、比較 TCG 精液稀釋液添加不同濃度海藻糖，評估解凍後的精子存活率、精子活力及精子頭帽完整性之差異。試驗結果顯示，在 TCG 稀釋液添加 0 mM、93.75 mM 及 187.5 mM 海藻糖，對於精子活力、存活率及精子頭帽完整性，在統計上均無顯著差異。

關鍵詞：山羊、精液、甘油、海藻糖。

緒言

冷凍保護劑之使用乃精液冷凍保存技術成功之關鍵因子，至今冷凍保護劑之抗凍作用機制尚未完全明瞭，而不同抗凍劑也有不同的效果。冷凍保護劑可分為滲透性冷凍保護劑 (penetrating cryoprotectant) 及非滲透性冷凍保護劑 (non-penetrating cryoprotectant)，兩種抗凍劑之作用部位分別在細胞內與細胞外。滲透性冷凍保護劑主要包括甘油 (glycerol)、乙二醇 (ethylene glycol; EG)、二甲基磺氧化物 (dimethyl sulfoxide; DMSO) 及丙二醇 (propylene glycol; PG) 等可滲透細胞膜的冷凍保護劑 (Purdy, 2006)，此類冷凍保護劑均為小分子，能隨不同滲透壓而自由進出細胞膜 (Holt, 2000)。非滲透性冷凍保護劑如蛋黃 (egg yolk)、脫脂乳粉

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1506 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所台東畜殖場。

(3) 國立屏東科技大學畜產系。

(4) 通訊作者，E-mail: janices@mail.tlri.gov.tw。

(skim milk powder) (Purdy, 2006) 及部分醣類如海藻糖 (trehalose)、葡聚糖 (dextran) 等，這類冷凍保護劑均屬於巨分子物質，無法通過細胞膜而進入細胞內 (Aisen *et al.*, 2002)。

由過去山羊精液冷凍保存之研究結果，發現使用 Tris-葡萄糖-檸檬酸-蛋黃 (Tris-glucose-citric acid-yolk; TCG) 精液稀釋液，其效果較脫脂乳粉 (Skimmed-milk; SKM) 稀釋液可改善山羊精子的活力與存活率 (章等, 2008)。近年來在家畜精液冷凍保存技術中，對添加冷凍保護劑如甘油 (Kundu *et al.*, 2000; Leboeuf *et al.*, 2000; Yi *et al.*, 2002.) 及海藻糖 (Aboagla and Terada, 2003, 2004; Bucak *et al.*, 2007) 等，以提高冷凍精液之品質已受到廣泛關注，因此為研製更為有效的冷凍稀釋液配方，以充分發揮優良種畜之生產潛力，本研究將採集之山羊精液，在冷凍前添加甘油與海藻糖，然後評估在冷凍前與冷凍後對精液品質之影響，以期尋求山羊精液冷凍保存之最佳條件。

材料與方法

I. 精液採集與處理

採用 6 頭年齡約 4 至 5 歲之阿爾拜因 (Alpine) 公羊，以假陰道法採取新鮮精液。採集之精液經鏡檢其總存活精子數及活力之後，使用精液洗滌液 (Krebs Ringer Phosphate Glucose Solution) 洗滌離心二次，其中第一次加入總精液量 10 倍之洗滌液混合，並以 $500 \times g$, 1500 rpm 離心 10 分鐘後，經去除上層懸浮液後，再依上述方法離心洗滌一次。其後以 TCG (Tris-glucose-citric acid-Yolk) 精液冷凍稀釋液 (成分如表 1) 進行稀釋，並使最終稀釋精液每毫升含有 5×10^8 個精子。已稀釋完成之精液先置於 4°C 平衡 2 小時，然後再裝填於 0.25 毫升的麥管中，並予封口。將已封口之麥管分別放置於液態氮液面上層約 16 公分處 -80°C 、2 分鐘，約 4 公分處 -110°C 、3 分鐘，然後再將麥管移入液態氮桶下方，以完成冷凍步驟。

表 1. 山羊精液冷凍稀釋液之組成

Table 1. The composition of semen extenders for goats

Components	TCG extender
Egg yolk (%)	2.5
Glucose (g)	0.625
Tris (tris (hydroxymethyl) aminomethane) (g)	3.786
Citric acid monohydrate (g)	2.172
Crystalline penicillin (IU/ml)	50
Streptomycin sulphate (g/ml)	50

TCG formula from Evans and Maxwell, 1987.

II. 試驗設計

試驗一在 TCG 精液稀釋液中添加 4% 及 7% 甘油，試驗二則分別在 TCG 精液稀釋液添加 0 mM、93.75 mM、187.5 mM 海藻糖，並比較在冷凍前、解凍後分別靜置於 37°C, 5 分鐘與 120 分鐘之精液性狀，項目包括：精子存活率、活力，而精子頭帽完整性評估則於解凍後立即進行檢查。

III. 精液性狀之評估

精液解凍時，先將麥管自液態氮儲存桶中取出，立即投入 37°C 溫水中解凍 30 秒，並於顯微鏡下評估解凍後精子之存活率與活力，以瞭解個別公羊精子之耐凍性。精子活力之檢測，取新鮮精液一小滴放置於預熱 37°C 之清潔載玻片上，並於 100 倍之顯微鏡下鏡檢精子之泳動波 (wave motion)，而精子活力等級之判定參考 Ax *et al.* (2000) 之方法，其範圍為 0-5，0- 表示所有精子完全不動，5- 表示精子處於最活潑的狀態無法個別觀察。精子存活率之評估方式，取原精液製成抹片，以 eosin-nigrosin 染劑進行染色，經快速風乾後置於 400 倍顯微鏡下鏡檢，若染成紅色者即代表死精子。每一抹片計算 200 隻精子，並以活精子數除以總精子數，即為精子之存活率。

IV. 精子頭帽完整性之評估

精子頭帽完整性之評估使用螢光素異硫氰酸鹽結合花生凝集素 Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) 法 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)，其步驟依據 Fazeli *et al.* (1997) 之方法稍作修正，即取精液樣品 30 μ L 塗抹於載玻片上，經空氣乾燥後，以甲醇固定 10 分鐘。取 30 μ L 含 FITC-PNA 之 PBS 溶液，滴置於載玻片上，再移於可控制濕度之 37°C 培養箱內靜置 30 分鐘後，再以 PBS 沖洗，並經空氣乾燥後使用 5 μ L 的 Antifade 溶液 (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) 封片，而此溶液可有效保持螢光效果。精子頭帽完整性之評估使用光學螢光顯微鏡，激發波長為 480 nm、射出波長為 530 nm，隨機取數個視野至少計數 100 個細胞，且每一樣品重覆計算六次。在顯微鏡下觀察山羊精細胞頭帽之染色，其判讀方式如下：

(1) 精細胞頭帽顯現完整密集明亮螢光，表示頭帽完整；(2) 精細胞頭帽顯現部份螢光，表示頭帽部份受損；(3) 精細胞頭帽未顯現螢光，表示頭帽之細胞膜及外頭帽層完全受損。

V. 統計分析

山羊冷凍精液稀釋液添加不同濃度冷凍保護劑之試驗所得資料，均以一般線性模式 (General linear Model Procedure, GLM) 進行分析，並以鄧肯式新多變域測定法 (Duncan's New Multiple Range Test) 比較山羊精液性狀在各處理間之差異顯著性 (SAS, 2005)。

結果與討論

本試驗比較在精液冷凍稀釋液中添加 4% 及 7% 甘油，經完成冷凍步驟後，再分別檢查冷凍前、解凍後、解凍後 37°C 靜置 5 分鐘及 120 分鐘之精液性狀，項目包括精子存活率及活力，試驗結果如表 2 與表 3。由表 2 與表 3 之結果顯示解凍後 37°C 靜置 5 分鐘與解凍後 37°C 靜置 120 分鐘，對精子活力與存活率方面在統計上並無顯著差異。

表 2. 精液稀釋液添加不同濃度甘油對精子活力冷凍保存之影響

Table 2. Effects of different concentrations of glycerol on sperm motility of semen extender during cryopreservation

Glycerol concentration (%) ¹	Before freezing	5 min postthawed	120 min postthawed
4	4.3±1.35	4.1±1.19	3.0±2.29
7	4.3±1.45	4.0±1.35	3.4±2.05

¹ No significant differences.

表 3. 精液稀釋液添加不同濃度甘油對精子存活率冷凍保存之影響

Table 3. Effects of different concentrations of glycerol on sperm viability of semen extender during cryopreservation

Glycerol concentration (%) ¹	Before freezing (%)	5 min postthawed (%)	120 min postthawed (%)
4	81.3±4.55	73.4±5.98	46.3±8.94
7	82.7±4.29	75.0±9.24	50.7±6.59

¹ No significant differences.

精子頭帽內含有許多能促進與卵子結合之酵素，而頭帽完整的精子與生育率具有高度的相關性（Saacke, 1972）；尤其是精液在冷凍-解凍過程中，常會造成相當程度之冷休克損害，故以頭帽完整性做為家畜精液品質之分析項目，以分辨冷凍精液品質之良窳（Saacke and White, 1972; Larson and Miller, 1999; Nagy *et al.*, 2004）。經由顯微鏡觀察，可了解精細胞膜與頭帽在冷凍解凍後之受損情形，其結果如表 4。由表 4 之結果顯示添加 4% 及 7% 甘油於山羊精液稀釋液，經冷凍解凍後，精子頭帽之受損比例在統計上並無顯著差異。

表 4. 精液稀釋液添加不同濃度甘油對冷凍解凍後山羊精子頭帽狀態之評估

Table 4. Effects of different concentrations of glycerol on acrosome status of the frozen-thawed goat spermatozoa

Glycerol concentration (%) ¹	Intact acrosome (%)	Partially damaged acrosome (%)	Damaged acrosome (%)
4	76.5±7.70	15.6±6.36	7.8±2.48
7	75.3±9.04	16.6±3.99	8.1±3.91

¹ No significant differences.

滲透性冷凍保護劑（penetrating cryoprotectant）的使用，可以避免在溫度下降過程對精子造成劇烈的冷凍傷害，其作用包括穩定細胞內溶質濃度的改變（Ostashko, 1968）及大量冰晶（ice crystal）（Farrant *et al.*, 1977; Devireddy *et al.*, 2000）的產生，增加膜流動性進而提升精子在冷凍保存過程之存活率（Holt, 2000）。Watson *et al.*（1990）認為，甘油為哺乳動物精子最早使用

的冷凍保護劑，具有對細胞膜的通透性強，以及冷凍保護效果佳等優點。然而使用甘油亦有其副作用，包括降低解凍後精子之活動力與精子穿透卵子能力，以及造成精子頭帽之傷害，進而影響受孕效果。甘油對精子之危害，尤其在常溫下對精子頭帽之損傷與對精液中特定酵素之破壞更加嚴重，因此適量降低甘油濃度為必要之措施（Fiser and Fairful, 1984; Jeyendran *et al.*, 1984; Fahy, 1986）。Chauhan and Anand（1990）比較三種在山羊精液稀釋液（EY-CG, EY-Tris, SM-EY）中添加不同濃度之甘油（1, 3, 5, 7 及 9%），結果發現在這三種稀釋液中均以添加 7% 甘油，對解凍後精子之活力及頭帽完整性評估均顯著優於其他濃度。Leboeuf（2000）建議在山羊精液之冷凍稀釋液中添加甘油之濃度範圍為 3%-9%，且以添加 4%-7% 為最適當。在本試驗中，比較 TCG 稀釋液中添加 4% 及 7% 甘油，結果顯示在冷凍解凍後 120 分鐘，二者之精子活力分別為 3.4 ± 2.05 與 3.0 ± 2.29 ，而精子存活率為 $46.3 \pm 8.94\%$ 與 $50.7 \pm 6.59\%$ ，二者在統計上均無顯著差異，故後續之試驗均採用添加 4% 甘油進行精子冷凍保存試驗。

山羊精液添加含 0 mM、93.75 mM 及 187.5 mM 海藻糖之稀釋液，經完成冷凍步驟後，檢查在冷凍之前、解凍後、解凍後 37°C 靜置 5 分鐘及 120 分鐘之精液性狀，項目包括精子存活率及活力，試驗結果如表 5 與表 6 所示。由表 5 與表 6 之結果顯示，解凍後 37°C 靜置 5 分鐘與解凍後 37°C 靜置 120 分鐘，對精子活力與存活率，在統計上並無顯著差異。發現精細胞膜與頭帽在冷凍解凍後之受損情形，試驗結果如表 7。由表 7 之結果顯示添加 0 mM、93.75 mM 及 187.5 mM 海藻糖於山羊精液稀釋液，並經冷凍解凍後，經由顯微鏡觀察受損比例在統計上並無顯著差異。

表 5. 精液稀釋液添加不同濃度海藻糖對精子活力冷凍保存之影響

Table 5. Effects of different concentrations of trehalose on sperm motility of semen extender during cryopreservation

Trehalose concentration (mM) ¹	Before freezing	5 min postthawed	120 min postthawed
0	4.7 ± 1.45	4.0 ± 1.65	3.6 ± 2.23
93.75	4.6 ± 1.53	3.9 ± 1.95	3.5 ± 2.56
187.5	4.7 ± 1.49	4.2 ± 1.43	3.2 ± 2.79

¹ No significant differences.

表 6. 精液稀釋液添加不同濃度海藻糖對精子存活率冷凍保存之影響

Table 6. Effects of different concentrations of trehalose on sperm viability of semen extender during cryopreservation

Trehalose concentration (mM) ¹	Before freezing (%)	5 min postthawed (%)	120 min postthawed (%)
0	82.7 ± 4.94	76.0 ± 9.37	40.3 ± 9.98
93.75	83.3 ± 5.59	75.3 ± 7.82	36.7 ± 9.26
187.5	84.3 ± 4.85	72.3 ± 9.72	33.7 ± 9.63

¹ No significant differences.

表 7. 精液稀釋液添加不同濃度海藻糖對冷凍解凍後山羊精子頭帽狀態之評估

Table 7. Effects of different concentrations of trehalose on acrosome status of the frozen-thawed goat spermatozoa

Trehalose concentration (mM) ¹	Intact acrosome (%)	Partially damaged acrosome (%)	Damaged acrosome (%)
0	77.4±5.14	16.9±8.39	5.7±8.56
93.75	75.7±6.84	15.5±6.97	8.8±6.12
187.5	77.8±2.96	15.8±7.51	6.4±8.87

¹ No significant differences.

在冷凍過程中，脫水常導致生物膜之結構與功能受到影響。海藻糖是一種雙醣，常存在許多物種中，如酵母菌與真菌孢子（Sussman and Lingappa, 1959）。許多研究探討海藻糖作用，發現可能使細胞膜於生理、物理功能發生改變時，提供維持之穩定狀態（Story *et al.*, 1998; Zeng and Terada, 2000; Ahn *et al.*, 2002），其保護作用機制仍未明，部分研究認為可能是透過滲透作用影響細胞膜組成成分中之磷脂而產生專一交互作用，導致在冷凍過程中使細胞脫水，而減少冰晶所造成之傷害（Fiser *et al.*, 1987; Molinia *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1998）。

研究在牛、綿羊之精液稀釋液中添加海藻糖，發現在解凍後可改善精子活力、頭帽完整性，因有效與精細胞膜成分脂質結合，提供較佳保護效果，進而減少精子受損數目（Chen *et al.*, 1993; Woelders *et al.*, 1997; Storey *et al.*, 1998; Aisen *et al.*, 2002; Bucak and Tekin, 2007）。另外，有研究證實冷凍保護劑，如海藻糖對精子之保護效果優於甘油（Rudolph *et al.*, 1985, 1986; Anchordoguy *et al.*, 1987）。據 Molinia *et al.*（1994）發現，不含甘油之精液稀釋液中，添加海藻糖對綿羊精液活力較佳於添加葡萄糖。

雖然本研究使用 TCG 配方添加不同濃度海藻糖，結果並無顯著效應，然而相關研究證實海藻糖具有益之影響（Aisen *et al.*, 2002; Aboagla and Terada, 2004）。Aboagla and Terada（2003）在山羊冷凍精液之研究指出，利用含海藻糖（93.75 mM、187.5 mM 及 375 mM）之稀釋液，對山羊精液冷凍後之精子活力、前進式活力（progressive motility）及平均路徑速度（average path velocity）均顯著優於不含海藻糖。另外，Aisen *et al.*（2000）之試驗結果顯示，含海藻糖之稀釋液，若合併添加 EDTA，可提升精子頭帽冷凍後完整性之比例，而更具有保護之作用。Chen *et al.*（1993）添加 0.05 M 及 0.1 M 之海藻糖於牛精液中，其效果並不顯著。另有研究亦證實精液稀釋液添加海藻糖，並於 37℃、3 小時體外培養具抗氧化作用，但於剛解凍時效果並不顯著（Aisen *et al.*, 2005）。Bucak *et al.*（2007）在綿羊精液添加 50 mM 海藻糖，結果有改善精子活力之效果，但添加 100 mM 海藻糖則對精子活力並無改善效果。Atessahin *et al.*（2008）在山羊精液添加 25 mM 海藻糖，結果發現對精子具有保護作用，但在精液添加 75 mM 海藻糖，則於冷凍解凍後精子之活力反而變差，推測可能因滲透壓增加之影響，因此日後宜再深入探討添加海藻糖之作用機制，及有關效應仍有待進一步研究確認。

誌謝

本試驗承農委會科技計畫 93 農科 -3.1.3- 畜 -L17 及 96 農科 -11.1.4- 畜 -L1（2）經費補助，使

本試驗得以順利進行，特此致謝，並承台東種畜繁殖場場長陳坤照添購儀器設備，試驗期間並承台東種畜繁殖場陳威成及張溪泉主任提供試驗羊隻及協助飼養管理，謹此一併致謝。

參考文獻

- 章嘉潔、吳昇陽、沈朋志。2008。山羊精液冷凍保存之研究。畜產研究 41: 27-34。
- Aboagla, E. M. and T. Terada. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. *Biol. Reprod.* 69: 1245-1250.
- Aboagla, E. M. and T. Terada. 2004. Effects of the supplementation of trehalose extender containing egg yolk with sodium dodecyl sulfate on the freezability of goat spermatozoa. *Theriogenology* 62: 809-818.
- Ahn, H. J., I. P. Sohn, H. C. Kwon, H. Jodo, Y. D. Park and C. K. Min. 2002. Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 61: 466-476.
- Aisen, E. G., H. L. Alvarez, A. Venturino and J. J. Garde. 2000. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology* 53: 1053-1061.
- Aisen, E. G., V. H. Medina and A. Venturino. 2002. Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology* 57: 1801-1808.
- Aisen, E., M. Quintana, V. Medina, H. Morello and A. Venturino. 2005. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology* 50: 239-249.
- Anchordoguy, T. J., A. S. Rudolph, J. F. Carpenter and J. H. Crowe. 1987. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology* 24: 324-331.
- Atessahin, A., M. N. Bucak, P. B. Tuncer and M. Kizil. 2008. Effects of anti-oxidant additive on microscopic and oxidative parameter of Angora goat semen following the freeze-thawing process. *Small Rumin. Res.* 77: 38-44.
- 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, In: *Reproduction in farm animals*. pp, 365-375, eds. Hafez, E. S. E. and B. Hafez. Lippincott Williams & Wilkins, South Carolina, USA.
- Bucak, M. N., A. Ateşşahin, O. Varışli, A. Yüce, N. Tekin and A. Akçay. 2007. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. *Theriogenology* 67: 1060-1067.
- Chauhan, M. S. and S. R. Anand. 1990. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. *Theriogenology* 34: 1003-1013.
- Chen, Y., R. H. Foote and C. C. Brackett. 1993. Effect of sucrose, trehalose, hypotaurine, taurine, and blood serum on survival of frozen bull sperm. *Cryobiology* 30: 423-431.
- Devireddy, R. V., D. J. Swanlund, K. P. Roberts, J. L. Pryor and J. C. Bischof. 2000. The effect of extracellular ice and cryoprotective agents on the water permeability parameters of human sperm plasma membrane during freezing. *Human Reprod.* 15: 1125-1135.
- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Sydney. p.127.
- Fahy, G. M. 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology* 23: 1-13.

- Farrant, J., C. A. Walter, H. Lee, G. J. Morris and K. J. Clarke. 1977. Structural and functional aspects of biological freezing techniques. *J. Microsc.* 111: 17-34.
- Fazeli, A., W. J. Hage, F. P. Cheng, W. F. Voorhout, A. Marks, M. M. Bevers and B. Colenbrander. 1997. Acrosome-intact boar spermatozoa initiate binding to the homologous zona pellucida in vitro. *Biol. Reprod.* 56: 430-438.
- 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.
- Holt, W. V. 2000. Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 3-22.
- Jeyendran, R. S., H. H. Van der Ven, W. Kennedy, M. Perez-Pelaez and L. J. Zaneveld. 1984. Comparison of glycerol and a zwitter ion buffer system as cryoprotective media for human spermatozoa: effect on motility, penetration of zona-free hamster oocytes, and acrosin/proacrosin. *J. Androl.* 5: 1-7.
- Kundu, C. N., J. Chakraborty, P. Dutta, D. Bhattacharyya, A. Ghosh and G. C. Majumder. 2000. Development of a simple sperm cryopreservation model using a chemically defined medium and goat caudal epididymal spermatozoa. *Cryobiology* 40: 117-125.
- Larson, J. L. and D. J. Miller. 1999. Simple histochemical stain for acrosomes on sperm from several species. *Mol. Reprod. Dev.* 52: 445-449.
- Leboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- Liu, Z., R. H. Foote and C. C. Brockett. 1998. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology* 37: 219-230.
- Mahadevan, M. M. and A. O. Trounson. 1984. Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. *Fertil. Steril.* 41: 287-293.
- Molinia, F. C., G. Evans and W. M. Maxwell. 1994. In vitro evaluation of zwitter ion buffers in diluents for freezing ram spermatozoa. *Reprod. Nutr. Dev.* 34: 491-500.
- Molinia, F. C., G. Evans, P. I. Casares and W. M. Maxwell. 1994. Effect of monosaccharide and disaccharides in Tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 35: 113-122.
- Nagy, S., T. Hallap, A. Johannisson and H. Rodriguez-Martinez. 2004. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 80: 225-235.
- Ostashko, F. I. and M. I. Lopatko. 1967. A low temperature generator with programmed freezing of sperm. *Veterinariia* 44: 102-103.
- Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin. Res.* 63: 215-225.
- Rudolph, A. S. and J. H. Crowe. 1985. Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology* 2: 367-377.
- Rudolph, A. S., J. H. Crowe and L. M. Crowe. 1986. Effects of three stabilizing agents-proline, betaine, and trehalose-on membrane phospholipids. *Arch Biochem. Biophys.* 245: 134-143.
- Saacke, R. G. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. p.17. NAAB In: Proc. 4 th Tech. Conf. Anim. Reprod. Artif. Insem.
- Saacke, R. G. and J. M. White. 1972. Semen quality tests and their relationship to fertility. In: Proceedings of the Fourth Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction, National Association of Animal Breeders, Columbia, MO, USA, pp. 22-27.

- SAS. 2005. User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Storey, B. T., E. E. Noiles and K. A. Thompson. 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology* 37: 46-58.
- Sussman, A. S. and B. T. Lingappa. 1959. Role of trehalose in acropore of *Neurospora tetrasperma*. *Nature* 130: 1343.
- Woelders, H., A. Matthij and B. Engel. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmotility of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. *Cryobiology* 35: 93-105.
- Yi, Y. J., Y. M. Cheon and C. S. Park. 2002. Effect of N-acetyl-D-glucosamine, and glycerol concentration and equilibration time on acrosome morphology and motility of frozen-thawed boar sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 69: 91-97.
- Zeng, W. X. and T. Terada. 2000. Freezability of boar spermatozoa is improved by exposure to 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Reprod. Fertil. Dev.* 12: 223-228.

Effect of the supplementation of glycerol and trehalose on semen extender of goat frozen semen ⁽¹⁾

Chia-Chieh Chang⁽²⁾⁽⁴⁾ Sheng-Yang Wu⁽²⁾ and Perng-Chih Shen⁽³⁾

Received : Feb. 21, 2008 ; Accepted : May 20, 2008

Abstract

This experiment was conducted to investigate the effects of glycerol and trehalose added to frozen semen extender on quality of frozen- thawed semen in goats. Semen collected from six Alpine bucks by use of an artificial vagina was diluted with Tris-glucose-citric acid-yolk (TCG) extender, which was brought to 5×10^8 cell/mL in the final concentration. The percentage of live sperm, motility and the acrosomal integrity of spermatozoa were recorded. In trial I, The effects of addition of 4% and 7% glycerol in TCG extenders were evaluated. It showed that no additional effect was found following addition of different concentration of glycerol into TCG extender. In trial II, the effects of addition of 0 mM, 93.75 mM and 187.5 mM trehalose into TCG extenders were evaluated. It showed that no additional effect was found following addition of different concentration of trehalose into TCG extender.

Key words : Goat, Semen, Glycerol, Trehalose.

(1) Contribution No. 1506 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Taitung Animal Propagation Station COA-LRI, Taitung, 954, Taiwan, R.O.C.

(3) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung 912, Taiwan, ROC.

(4) Corresponding author, E-mail: janices@mail.tlri.gov.tw