

不同稀釋液配方對台灣黑山羊精液冷藏或冷凍保存後精子活力及存活率之影響⁽¹⁾

王得吉⁽²⁾ 康定傑⁽³⁾ 林信宏⁽⁴⁾ 黃政齊⁽²⁾⁽⁵⁾

收件日期：97年12月15日；接受日期：98年3月20日

摘要

本試驗目的為探討利用不同稀釋液 (Skimmed milk; SKM, Egg yolk-Tris-Fructose; YTF, Tris-Citrate acid-Glucose-Egg yolk; TCG-Y 及 Tris-Citrate acid-Glucose-Egg yolk-Cholesterol-Loaded Cyclodextrin; TCG-Y-CLC) 配方對山羊精液於冷藏與冷凍保存之影響。在正常繁殖季節中，運用假陰道法進行 3 頭黑山羊公羊之新鮮精液採集。將個別精液混合並予以離心去除精漿後，隨即利用不同稀釋液進行稀釋，稀釋精液儲存於 4℃ 冰箱中或液態氮中。冷藏精液每隔 24 小時至第 5 天，分別取出回溫至 37℃ 並培養 0 至 7 小時；冷凍精液取出回溫至 37℃ 並培養 0 至 5 小時，以供評估精子存活率及活力。試驗結果顯示，冷藏精液以 TCG 為基礎之稀釋液 (TCG-Y 及 TCG-Y-CLC) 進行精液稀釋與保存後，精子存活率及活力皆顯著 ($P < 0.05$) 高於 YTF 及 SKM 稀釋液。冷凍精液經解凍並回溫於 37℃ 持續培養至 5 小時後，以 YTF 組之精子存活率顯著 ($P < 0.05$) 高於 SKM 及以 TCG 為基礎之稀釋液。

關鍵詞：山羊精液、稀釋液、冷藏、冷凍、冷凍保存。

緒言

人工授精技術是改良家畜遺傳性能之重要技術，一頭優秀之種公羊若以採精取得精液製作成冷凍精液，則一年內約可配種一千五百頭以上之母羊，此對遺傳性能改進之影響甚鉅，故於歐美等畜產業先進之國家，乳牛與肉牛冷凍精液之商業化生產早已行之多年，然因山羊並非主要之經濟家畜，因此山羊冷凍精液之相關研究相形較少。此外，雖然冷凍精液有保存期限長及運

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1507 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(4) 行政院農業委員會畜產試驗所高雄種畜繁殖場。

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

輸方便之優點，然而，冷凍精液在精子存活率、活力，甚至受胎率等方面，仍較新鮮精液為低（Leboeuf *et al.*, 2000；Karatzas *et al.*, 1997），費用也較為昂貴，而且在保存上需要經常性的維持費用。因此，對於擁有優良種公羊之養羊場而言，若能利用新鮮採取及稀釋之精液進行人工授精，不但可以充分利用種公羊資源，而且可以減少飼養種公羊的頭數。新鮮稀釋精液的缺點是保存期限短，法國之文獻報告指出，稀釋後未能在短時間內使用完畢之山羊精液，在冷藏之條件下較高的受精力只能維持 24 小時（Leboeuf *et al.*, 2000），因此大幅限制山羊新鮮稀釋精液的應用，亟需要研究加以改善。本試驗即針對山羊精液利用不同稀釋液配方進行冷凍與冷藏保存，並對精液解凍與回溫後精子存活率及活力之影響進行評估，以作為日後研究與產業推廣之參考。

材料與方法

I. 試驗動物與飼養管理

試驗於 2007 年 1-3 月間進行，運用假陰道法進行 3 頭 2-4 歲齡之台灣黑山羊新鮮混合精液採集。每週採取 3 次，每次間隔一天。採集之混合精液經稀釋 200 倍後於顯微鏡下評估，選取存活率在 80% 以上及活力為 4 以上者供試驗進行。試驗羊隻圈飼於個別羊欄，欄舍內提供飲水、礦鹽及乾草任食，每日並補充肉羊精料 0.4 kg。

II. 精液之處理

(i) 冷凍精液製作流程

採集後之新鮮精液經鏡檢後等量分為 4 管，分別加入原精液量 5 倍量之洗滌液（Corteel *et al.*, 1974），緩慢混合後，以 1250 rpm ($210\times g$) 進行離心 10 分鐘後，移除上層澄清液體後，再加入 5 倍量之洗滌液，重複上述離心條件一次。其後分別加入 SKM（Skimmed milk）、YTF（Egg yolk-Tris-Fructose）、TCG-Y（Tris-Citrate acid-Glucose-Egg yolk）及 TCG-Y-CLC（Tris-Citrate acid-Glucose-Egg yolk-Cholesterol-Loaded Cyclodextrin）等第一階段冷凍稀釋液進行等量稀釋，使稀釋精液最終濃度達每毫升 5×10^8 個精子。將稀釋精液置入 4℃ 冷房中平衡 2 小時後，等量加入第二階段冷凍稀釋液進行稀釋，使稀釋精液最終濃度達每毫升 2.5×10^8 個精子，然後裝填至 0.5 毫升麥管中並予以封粉。最後將麥管排列於麥管架上，以兩階段方式於液態氮液面上方進行短暫平衡，最終將麥管迅速移入液態氮中，完成精液冷凍程序。將麥管裝入標示日期、耳號的鋁架上，儲存於液態氮桶中一星期以上。

(ii) 冷藏精液製作流程

方法如 II 之 (i) 所述，精子洗滌後分別緩慢加入四種不同稀釋液。稀釋精液採用緩慢降溫方式 ($0.3^{\circ}\text{C}/\text{min}$)，在兩小時內降至 4℃，之後即存放於 4℃ 冰箱中保存。

III. 試驗設計

比較 SKM、YTF、TCG-Y 及 TCG-Y-CLC 等四種不同冷凍稀釋液，於冷凍精液解凍後，分別培養於 37℃，0 小時及 5 小時後，測定精子活力與存活率。精液冷藏試驗中則比較上述四種不同冷凍稀釋液，於冷藏精液分別儲存於 4℃ 中 0、24、48、72、96 及 120 小時，取出部份精液回溫並分別培養於 37℃，0 及 7 小時後，測定精子活力與存活率。

IV. 解凍後精子性狀之評估

存活率評估是依照 Roca *et al.* (1996) 所述之 eosin-nigrosin 染色法進行染色，其方式為將精液以該染劑進行染色後，風乾並置於 400 倍顯微鏡下鏡檢，若染成紅色即代表為死精子。每一抹片隨機挑選 3 視野，每一視野計算至少 200 個精子，然後將活精子數除以總精子數即為精子之存活率。精子活力之等級評估亦是依照 Roca *et al.* (1996) 所述之方式進行，其方式為將精液置於 100 倍顯微鏡下觀察精液之泳動波，再依其等級判定標準進行判斷，其範圍為 0-5 級分。

V. 統計分析

試驗期間所收集之資料均以套裝統計分析系統 (SAS, 1998) 進行分析，而測定值以平均值±標準偏差 (Mean±SD) 表示，並以鄧肯氏多變域測定法 (Duncan's Multiple Range Test) 比較山羊精液性狀之差異顯著性。

結果與討論

I. 不同稀釋液配方對精液冷藏之影響

利用不同稀釋液配方進行山羊精液冷藏保存，其回溫後精子存活率及活力如表 1 及表 2 所示。不同稀釋液配方間於冷藏後 0 及 24 小時，精子存活率無顯著差異，而精子活力則於 0 至 96 小時間無顯著差異。含蛋黃之稀釋液配方 (YTF、TCG-Y 及 TCG-Y-CLC) 雖於冷藏後 48 小時其存活率顯著 ($P < 0.05$) 低於脫脂乳粉 (SKM) 稀釋液，但於 120 小時後其存活率與活力則顯著 ($P < 0.05$) 高於脫脂乳粉稀釋液。此外，以 TCG 為基礎之稀釋液 (TCG-Y 及 TCG-Y-CLC) 於保存第 0、24、48、72、96 及 120 小時後，在 37°C 培養 7 小時之精子存活率及活力皆顯著 ($P < 0.05$) 優於 YTF 及 SKM 稀釋液。公羊精液使用蛋黃稀釋液冷藏保存可維持高活力 (Azawi *et al.*, 1993)，而本實驗資料與之吻合。含蛋黃之稀釋液配方中，蛋黃以一定比率添加可維持精子存活，保護冷休克傷害，此可能與蛋黃內 lecithin 成分有關 (Blackshaw, 1954)，而能進一步降低精子之損害致影響受孕力 (Gones and Martin, 1973)。Watson (1981, 1995) 研究中亦指出，精子冷休克傷害的發生是在當溫度由 20°C 降至 5°C 時所產生，此時添加含有磷脂成分的蛋黃至稀釋液中，可保護精子細胞質膜抵抗冷休克所造成之影響。此外，含蛋黃稀釋液配方之另一重要成分 -Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)，據 Salamon and Ritar (1982) 證實可延長冷藏保存時間，其原理乃藉由創造一穩定緩衝區，以中和精子活動後所產生之二氧化碳，避免精子所處之環境酸化。Paulenz *et al.* (2002) 之研究中亦顯示，公羊精液以 Tris 為基礎之稀釋液較脫脂乳粉稀釋液於低溫長時間保存時有著較佳的精子存活率，在本試驗亦有一致之結果。

表 1. 不同精液稀釋液保存於 4℃ 後，分別於 37℃ 培養 0 小時及 7 小時對精子存活率之影響

Table 1. Effects of different diluents on percentage of live sperm at 4℃ after 0 and 7 hours of incubation under 37℃

Storage time	Incubation time	Diluents			
		SKM	YTF	TCG-Y	TCG-Y-CLC
0-hour	0-hour	88.8 ± 2.5	88.8 ± 2.5	86.3 ± 2.5	87.5 ± 2.9
	7-hours	23.8 ± 4.8 ^c	47.5 ± 5.0 ^b	57.5 ± 2.9 ^a	57.5 ± 2.9 ^a
24-hours	0-hour	88.8 ± 2.5	86.3 ± 2.5	82.5 ± 2.9	87.5 ± 2.9
	7-hours	22.5 ± 2.9 ^c	36.3 ± 4.8 ^b	52.5 ± 2.9 ^a	56.3 ± 2.5 ^a
48-hours	0-hour	88.8 ± 2.5 ^a	81.3 ± 2.5 ^b	81.3 ± 2.5 ^b	82.5 ± 2.9 ^b
	7-hours	18.8 ± 2.5 ^c	32.5 ± 5.0 ^b	47.5 ± 2.9 ^a	47.5 ± 5.0 ^a
72-hours	0-hour	82.5 ± 2.9 ^a	78.8 ± 2.5 ^a	71.3 ± 2.5 ^b	81.3 ± 2.5 ^a
	7-hours	23.8 ± 4.8 ^b	27.5 ± 5.0 ^b	46.3 ± 4.8 ^a	45.5 ± 5.8 ^a
96-hours	0-hour	61.3 ± 2.5 ^a	57.5 ± 2.9 ^a	51.3 ± 2.5 ^b	52.5 ± 2.9 ^b
	7-hours	16.3 ± 2.5 ^b	18.8 ± 2.5 ^b	36.3 ± 4.8 ^a	38.8 ± 2.5 ^a
120-hours	0-hour	41.3 ± 2.5 ^b	52.5 ± 2.9 ^a	52.5 ± 5.0 ^a	51.3 ± 2.5 ^a
	7-hours	5.0 ± 5.8 ^c	18.8 ± 2.5 ^b	27.5 ± 2.9 ^a	32.5 ± 5.0 ^a

^{abc} : Means with different superscripts within same column are significantly different (P < 0.05) .

SKM : cow skimmed milk powder –glucose.

YTF : egg yolk-Tris-fructose.

TCG-Y : Tris-citrate acid- glucose- egg yolk

TCG-Y-CLC : Tris-citrate acid- glucose- egg yolk- cholesterol-loaded cyclodextrin.

表 2. 不同精液稀釋液保存於 4℃ 後，分別於 37℃ 培養 0 小時及 7 小時對精子活力之影響

Table 2. Effects of different diluents on sperm motility at 4℃ after 0 and 7 hours of incubation under 37℃

Storage time	Incubation time	Diluents			
		SKM	YTF	TCG-Y	TCG-Y-CLC
0-hour	0-hour	4.8 ± 0.5	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
	7-hours	1.8 ± 0.5 ^c	2.5 ± 0.6 ^b	4.0 ± 0.0 ^a	4.0 ± 0.0 ^a
24-hours	0-hour	5.0 ± 0.0	4.8 ± 0.5	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
	7-hours	1.8 ± 0.5 ^b	1.8 ± 0.5 ^b	3.8 ± 0.5 ^a	4.0 ± 0.0 ^a
48-hours	0-hour	4.5 ± 0.6	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
	7-hours	1.8 ± 0.5 ^b	1.8 ± 0.5 ^b	3.5 ± 0.6 ^a	3.5 ± 0.6 ^a
72-hours	0-hour	5.0 ± 0.0	4.8 ± 0.5	5.0 ± 0.0	5.0 ± 0.0
	7-hours	1.5 ± 0.6 ^b	1.5 ± 0.6 ^b	3.5 ± 0.6 ^a	3.5 ± 0.6 ^a
96-hours	0-hour	3.5 ± 0.6	3.8 ± 0.5	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
	7-hours	1.0 ± 0.8 ^b	1.3 ± 0.5 ^b	2.8 ± 0.5 ^a	2.8 ± 0.5 ^a
120-hours	0-hour	2.5 ± 0.6 ^b	3.8 ± 0.5 ^a	4.0 ± 0.0 ^a	4.0 ± 0.0 ^a
	7-hours	0.5 ± 0.6 ^c	1.5 ± 0.6 ^b	2.5 ± 0.6 ^a	2.5 ± 0.6 ^a

^{abc} : Means with different superscripts within same column are significantly different (P < 0.05) .

SKM : cow skimmed milk powder –glucose.

YTF : egg yolk-Tris-fructose.

TCG-Y : Tris-citrate acid- glucose- egg yolk.

TCG-Y-CLC : Tris-citrate acid- glucose- egg yolk- cholesterol-loaded cyclodextrin.

II. 不同稀釋液配方對山羊精液冷凍解凍後之影響

利用不同稀釋液配方進行山羊精液液態氮冷凍保存，其解凍後精子存活率及活力如表 3 及表 4 所示。冷凍精液於 37°C 解凍後立即鏡檢觀察（0 小時），於不同稀釋液配方間精子存活率與活力並無顯著差異。但於 37°C 培養 1 小時後，以 YTF 組之精子存活率（ $68 \pm 4.5\%$ ）顯著（ $P < 0.05$ ）優於其它三組（SKM： 39 ± 2.2 ；TCG-Y： 58 ± 4.5 ；TCG-Y-CLC： 61 ± 2.2 ）；而於 37°C 持續培養至 5 小時後，仍以 YTF 組之精子存活率（ $27 \pm 7.6\%$ ）顯著（ $P < 0.05$ ）優於其它三組（SKM： 0 ± 0.0 ；TCG-Y： 5.4 ± 2.9 ；TCG-Y-CLC： 15 ± 5.0 ）。試驗結果顯示，利用 SKM、YTF、TCG-Y 及 TCG-Y-CLC 等四種不同稀釋液配方進行山羊冷凍精液製作時，其解凍後對精子存活率上雖無顯著差異，但經 1 至 5 小時培養後則產生顯著性差異，其中以 YTF 稀釋液所製作之冷凍精液經解凍培養 1 至 5 小時後精子存活率最高；而 SKM 稀釋液所製作之冷凍精液經解凍後經 37°C、1 小時培養後，其精子存活率則開始顯著低於其他稀釋液配方所製作者，且經 37°C、3 小時以上培養後幾乎無任何存活精子。

表 3. 不同稀釋液配方在解凍後經培養於 37°C，0 小時至 5 小時後對精子存活率之影響

Table 3. Effects of different diluents on percentage of live sperm (%) in post-thaw semen incubated at 37°C for 0 to 5 hours

Diluents	Time of post-thawing					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
SKM	81 ± 2.2	39 ± 2.2^c	17 ± 4.5^c	7 ± 2.7^c	0 ± 0.0^c	0 ± 0.0^d
YTF	80 ± 3.5	68 ± 4.5^a	65 ± 5.0^a	$46 \pm 8.^a$	35 ± 5.0^a	27 ± 7.6^a
TCG-Y	80 ± 3.5	58 ± 4.5^b	47 ± 4.5^b	26 ± 8.9^b	15 ± 7.1^b	5.4 ± 2.9^c
TCG-Y-CLC	81 ± 2.2	61 ± 2.2^b	54 ± 5.5^b	36 ± 5.5^{ab}	23 ± 4.5^b	15 ± 5.0^b

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

SKM : cow skimmed milk powder –glucose.

YTF : egg yolk-Tris-fructose.

TCG-Y : Tris-citrate acid- glucose- egg yolk.

TCG-Y-CLC : Tris-citrate acid- glucose- egg yolk- cholesterol-loaded cyclodextrin.

表 4. 不同稀釋液配方在解凍後經培養於 37°C，0 小時至 5 小時後對精子活力之影響

Table 4. Effects of different diluents on sperm motility in post-thaw semen incubated at 37°C for 0 to 5 hours

Diluents	Time of post-thawing					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
SKM	5 ± 0	2.6 ± 0.49^b	1 ± 0^b	0.6 ± 0.55^c	0 ± 0^c	0 ± 0^c
YTF	5 ± 0	5 ± 0^a	4.8 ± 0.45^a	4.4 ± 0.89^a	3.2 ± 0.45^a	2.4 ± 0.55^a
TCG-Y	5 ± 0	5 ± 0^a	4.6 ± 0.55^a	2.8 ± 0.45^b	2.2 ± 0.84^b	0.8 ± 0.45^b
TCG-Y-CLC	5 ± 0	5 ± 0^a	4.6 ± 0.55^a	4.2 ± 0.84^a	2.8 ± 0.84^{ab}	2.2 ± 0.84^a

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

SKM : cow skimmed milk powder –glucose.

YTF : egg yolk-Tris-fructose.

TCG-Y : Tris-citrate acid- glucose- egg yolk.

TCG-Y-CLC : Tris-citrate acid- glucose- egg yolk- cholesterol-loaded cyclodextrin.

冷凍稀釋液添加的目的主要是提供精子細胞能量之來源、保護精子細胞在降低溫度所造成的傷害及維持其暫時存活的適當環境。曾被使用過的山羊精液稀釋液之種類繁多 (Memon and Ott, 1981; Salamon and Maxwell, 1995)，然而在實用上仍以脫脂乳粉及蛋黃兩種稀釋液較為普遍 (Chemineau *et al.*, 1991)。由本試驗結果顯示，使用含有蛋黃之稀釋液 (YTF、TCG-Y 及 TCG-Y-CLC) 對山羊精子的冷凍保存效果較脫脂乳粉稀釋液 (SKM) 者為佳，此與 Salamon and Maxwell (1995) 所得之結果相似，此乃因蛋黃中含有脂蛋白與磷脂，具有穩定精子細胞膜之作用 (de Leeuw *et al.*, 1991)。此外，YTF 稀釋液中所含之蛋黃液未經離心過程，而 TCG 稀釋液中所含之蛋黃液則經離心處理後再加入，因此蛋黃液經高速離心後雖可去除許多大分子物質，但是否也同時將某些冷凍保護物質移除，而致 YTF 稀釋液在精子解凍並經短暫培養後之表現優於其他蛋黃稀釋液，則需進一步探討。

當精子進行冷凍過程時，會誘發精子產生結構上的變化，其中包含其細胞質膜的不穩定性 (Steponkus *et al.*, 1983)。細胞質膜的不穩定將造成精子細胞內冰晶之形成，最後導致精子細胞死亡 (Mazur *et al.*, 1984)，而細胞質膜不穩定現象的發生是在溫度下降時，細胞質膜經歷從液態相到膠體相的轉變過程中所產生。然而這種細胞質膜態相之轉變可藉由精子在冷凍前添加膽固醇而予以消除 (Ladbrooke *et al.*, 1968)。因此本試驗中嘗試於精子冷凍前添加膽固醇 (CLC) 與其作用，而經冷凍後解凍與未添加者 (TCG-Y) 比較之結果顯示，在精子存活率及活力上並無明顯差異，此結果與 Purdy 及 Graham (2004) 於牛精子冷凍試驗之結果不盡相同，此是否為膽固醇添加量不適所造成之結果亦需進一步探討。儘管如此，精液在冷凍前添加膽固醇經 37°C、5 小時培養後，仍較未添加者 (TCG-Y) 有顯著之改善效果。

結論

本試驗利用四種不同稀釋液配方進行山羊精液冷藏與冷凍保存。結果顯示 TCG-Y 及 TCG-Y-CLC 稀釋液於精液冷藏保存後，再經 37°C、7 小時培養，其精子存活率及活力均顯著高於 SKM 與 YTF 稀釋液；而 YTF 稀釋液於精液冷凍解凍後再經 37°C、5 小時培養，其精子存活率及活力均顯著高於 SKM 與 TCG-Y 稀釋液。本研究之結果可供作未來山羊相關生殖生理研究與推廣之參考。

參考文獻

- Azawi, O. I., S. Y. A. Al-Dahash and F. T. Juma. 1993. Effect of different diluents on Shami goat semen. *Small Rumin. Res.* 9: 347~352.
- Blackshaw, A. W. 1954. The prevention of temperature shock of bull and ram semen. *Aust. J. Biol. Sci.* 7: 573-582.
- Chemineau, P., Y. Cognie, Y. Guerin, P. Orgeur and J. C. Vallet. 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goat. FAO, UN, Rome. pp.115-162.
- de Leeuw, F. E., B. Colenbrander and A. J. Verkleij. 1991. Effects of various bull semen extender on plasma membrane integrity. *Cryobiology* 28: 45. (Abst.)
- Gones, R. C. and I. C. A. Martin. 1973. The effects of dilution egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 35: 311-320.
- Karatzas, G., A. Karagiannidis, S. Varsakeli and P. Brikas. 1997. Fertility of fresh and frozen-thawed goat

- semen during the nonbreeding season. *Theriogenology* 48: 1049-1059.
- Ladbrooke, B. D., R. M. Williams and D. Chapman. 1968. Studies on lecithin-cholesterol-water interactions by differential scanning calorimetry and X-ray diffraction. *Biochim. Biophys. Acta.* 150: 333-340.
- Leboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- Mazur, P., W. F. Rall and S. P. Leibo. 1984. Kinetics of water loss and likelihood of intracellular freezing in mouse ova: influence of the method of calculating the temperature dependence of water permeability. *Cell Biophys.* 6: 197-214.
- Memon, M. A. and R. S. Ott. 1981. Methods of semen preservation and artificial insemination in sheep and goats. *World Rev. Anim. Prod.* 17: 19-26.
- Moussa, M., V. Martinet, A. Trimeche, D. Tainturier and M. Anton. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method in cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57: 1695-1706.
- Paulenz, H. L. Soderquist, R. Perez-Pe and K. A. Berg. 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57: 823-836.
- Purdy, P. H. and J. K. Graham. 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology* 48: 36-45.
- Roca, J., J. A. Carrizosa, I. Campas, A. Lafuente, J. M. Vazquez and E. Martinize. 1996. Viability and fertility of unwashed Murciano-Granadina goat spermatozoa diluted in Tris-egg yolk extender and stored at 5°C. *Small Rumin. Res.* 25: 147-153.
- Salamon, S. and W. M. C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37: 185-249.
- SAS. 1998. SAS/STAT Users Guide Release 6.03 ed. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Steponkus, P. L., M. F. Dowgert and W. J. Gordon-Kamm. 1983. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation. *Cryobiology* 20: 448-465.
- Watson, P. F. 1981. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: *The effects of low temperatures on biological membranes*, Morris, G. J., Clarke, A. (Eds.) Academic Press, London, pp. 189-218.
- Watson, P. F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 871-891.

Effect of different diluents on sperm viability and motility in semen stored in cooling or freezing environment ⁽¹⁾

De-Chi Wang⁽²⁾ Ting-Chieh Kang⁽³⁾ Hsin- Hung Lin⁽⁴⁾
and Jan-Chi Huang⁽²⁾⁽⁵⁾

Received : Dec. 15, 2008 ; Accepted : Mar. 20, 2009

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of different diluents including SKM (Skimmed milk), YTF (Egg yolk-Tris-Fructose), TCG-Y (Tris-Citrate acid-Glucose-Egg yolk) and TCG-Y-CLC (Tris-Citrate acid-Glucose-Egg yolk-Cholesterol-Loaded Cyclodextrin) on the quality of goat semen stored at 4°C or -196°C. Semen were collected from three bucks of Taiwan Black Goat via the artificial vagina during the breeding season. Semen were pooled and subjected to the dilution with different diluents after removal of seminal plasma by centrifugation. Diluted semen were either stored at 4°C in refrigerator or frozen in liquid nitrogen. Percentage of live spermatozoa and motility score of them were assessed after 0 to 7 h of incubation at 37°C, every 24 h up to day 5 for the cooled semen while they were merely assessed after 0 to 5 h at 37°C for the frozen-thawed semen. The percentage of live spermatozoa and the motility score of sperm diluted with TCG were significantly ($P < 0.05$) higher than those of diluted with SKM and YTF during stored at 4°C. However, the percentage of live spermatozoa of frozen-thawed semen diluted with YTF and incubated at 37°C for 5 h after thawing were significantly ($P < 0.05$) higher than those of diluted with SKM and TCG. These results indicated that TCG was an adequate extender for cool storage while YTF was a better extender for long term cryopreservation of buck semen.

Key words : Goat semen, Diluents, Cooling, Freezing, Cryopreservation.

(1) Contribution No.1507 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hengchun Branch Institute, COA-LRI, Hengchun, Pingtung 946, Taiwan, R.O.C.

(3) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua, Tainan 712, Taiwan, R.O.C.

(4) Kaohsiung Animal Propagation Station, COA-LRI, Pingtung 912, Taiwan, R.O.C.

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