

# 豬冷凍精液解凍稀釋液之研究<sup>(1)</sup>

章嘉潔<sup>(2)(3)</sup> 吳昇陽<sup>(2)</sup>

收件日期：98年3月2日；接受日期：98年7月10日

## 摘要

本試驗比較 Lactose-egg yolk (LEY) extender、Beltsville thaw solution (BTS)、Kiev 與 Androhep 等四種解凍稀釋液對豬冷凍精液解凍後品質的影響。選擇生殖能力正常，平均年齡 2.5 歲之健康杜洛克公豬 8 頭，採取新鮮精液進行冷凍精液製作，並評估解凍後的精子存活率、精子總活力、精子前進式活力等項目之差異。試驗結果顯示，使用 LEY 解凍稀釋液，對於精子存活率、精子總活力、精子快速前進式活力等，均顯著低於使用 BTS、Kiev 與 Androhep 等稀釋液 ( $P < 0.05$ )；而使用 BTS 解凍稀釋液，對豬冷凍精液解凍後之精子存活率、精子總活力、精子快速前進式活力，均顯著優於使用 Kiev 稀釋液 ( $P < 0.05$ )。

關鍵詞：精液、解凍、豬。

## 緒言

新鮮精液進行人工授精已廣泛應用於養豬業 (Yeste, 2008)，但冷凍精液的使用並不普遍。主要原因在於冷凍精液仍存在解凍後精子存活率低、受胎率低、產仔數較新鮮精液少等問題 (Almid and Hofo, 1996; Johnson *et al.*, 2000; Bolarin *et al.*, 2006)，加上冷凍精液之生產成本較高，需較高的技術，且處理過程較複雜，操作技術和設備要求較為嚴格 (Zeng and Terada, 2001)，使得冷凍精液一直難以在養豬業大規模推廣應用。其關鍵問題在於冷凍解凍過程所造成之物理及化學性損害，影響精子之存活率及受胎率 (Hammerstedt *et al.*, 1990; Purdy, 2006)。研究顯示，解凍過程中存在某些影響精子存活率之因素 (Cordova-Izquierdo *et al.*, 2006)。目前冷凍精液的研究，大多集中在探討冷凍技術，而在解凍技術的研究相對較少，以致在實際應用上之知識仍然不足。

精子活力之百分比常作為評估精子品質之指標 (Johnson *et al.*, 2000)，傳統測定家畜精子活力之方法是使用顯微鏡目測法，該法在現場應用雖簡便，但主觀性強，準確性差 (Vyt *et al.*, 2004)；研究顯示其與實際受孕力相關性不高 (Linford *et al.*, 1976; Kommisrud *et al.*, 2002)。

---

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1526 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所台東種畜繁殖場。

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

精液分析儀CASA系統（CASA, computer-assisted semen analysis）廣泛使用在人類精子的研究及人工生殖，並證實精子活動速率與受胎率有密切相關（Marshburn *et al.*, 1992; Barrat *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 2000）；精液分析儀應用在豬精子的研究亦有一致的結果（Holt *et al.*, 1997; Vyt *et al.*, 2004），並可評估精子之快速前進式活力，不會損害其代謝與細胞膜之完整性，因此能提供較客觀及正確資訊（Amann and Katz, 2004）。

本試驗旨在探討目前廣泛使用之精液稀釋液，並於解凍後分別靜置於 37°C, 7 小時，然後進行精子存活率、總活力、快速前進式活力之評估，以篩選出高效率的解凍稀釋液，期能提供豬冷凍精液推廣應用之參考。

## 材料與方法

### I. 精液採集與處理

本試驗選擇生殖能力正常，平均年齡 2.5 歲之健壯杜洛克公豬 8 頭，每週採集公豬精液一次。精液採集後立即進行常規檢查，並在 37°C 下靜置 30 分鐘後再選取存活率 80% 以上與活力 75% 以上的精液進行冷凍保存。

### II. 精液之冷凍

採集之精液選取濃厚部份，經鏡檢精液品質後，使用 BTS（成分如表 1）進行精液稀釋。稀釋之精液在 3 小時內冷卻至 15°C，然後於 15°C, 800 ×g 離心 10 分鐘，去除上清液後添加冷凍稀釋液（I）（11% lactose 及 20% egg yolk）mL 稀釋精液，然後再添加冷凍稀釋液（II）（11% lactose, 20% egg yolk, 9% glycerol and 1.5% Equex STM）mL 稀釋精液，再經過 2 小時冷卻至 5°C，使最終精子濃度為  $1 \times 10^9$  cells/mL。稀釋冷卻完成之精液裝填於 5 mL 之麥管，並以塑膠珠封住兩端，然後將麥管移置於電腦程式控制儀（Ice cube 14S, Minitub）內，執行冷凍程式降溫；其中溫度在 5°C 至 -5°C，以每分鐘下降 3°C 之速率進行，最後再將完成冷凍之麥管移入液氮桶內貯存（Westendorf *et al.*, 1975; Bwanga *et al.*, 1991）。

### III. 冷凍精液之解凍過程

備妥解凍用稀釋液，使回溫至 25°C；並迅速從液氮桶內取出所需之冷凍精液，將麥管依 50°C, 45 秒進行解凍。擦乾麥管表面之水分，先剪開麥管之一端，其次再剪開另一端，讓精液流入 80 mL（25°C）解凍用稀釋液 LEY、BTS、Kiev 與 Androhep（成分如表 1），然後進行解凍後之精液性狀測試，並靜置於 37°C, 7 小時。靜置期間儘可能避免精液受到溫度變化及光線傷害；並每隔 1 小時使用顯微鏡及精液分析儀評估精液品質，項目包括：精子存活率、精子總活力、精子快速前進式活力。

### IV. 精液性狀之評估

表 1. 公豬解凍稀釋液之組成

Table 1. The composition of boar semen extenders for thawing

Components	LEY <sup>a</sup>	BTS <sup>b</sup>	Kiev <sup>c</sup>	Androhep <sup>d</sup>
Egg yolk (mL)	20			
Lactose (mL)	80			
Glucose (g/L)		37.0		
EDTA (g/L)		1.25		
Sodium citrate (g/L)		6.0	3.7	8.0
Sodium bicarbonate (g/L)		1.25	1.2	1.2
Potassium chloride (g/L)		0.75		
HEPES (g/L)				9.0
BSA (g/L)				2.5
Gentamicin sulfate (mg/L)	300	300	300	300

<sup>a,b</sup> Pursel and Johnson, 1975.<sup>c</sup> Johnson *et al.*, 1982.<sup>d</sup> Waberski *et al.*, 1994.

精液解凍後，精液品質之檢測使用 CASA (VideoTesT-Sperm 2.1, VideoTesT-Metel, Russia)，其方法為取 5  $\mu$ L 含解凍稀釋液之精液放置於 Makler counting chamber (Makler, OC, Microcell etc.) 進行評估。精子活力指數是依 WHO (World Health Organization) 之標準：1.總活力定義為細胞移動速率  $VAP > 10 \mu m/sec$ ，2.快速前進式活力 (rapid progressive motility, RPM) 定義為細胞移動速率  $VAP > 25 \mu m/sec$ ；受測溫度為 37°C。存活率之評估取原精液製成抹片，以伊紅 - 尼格羅黑 (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。

#### V. 統計分析

豬冷凍精液使用不同稀釋液解凍後，靜置於 37°C，7 小時，並每間隔 1 小時評估其存活率、總活力、前進式活力；試驗所得資料以一般線性模式 (General Linear Model Procedure, GLM) 及鄧肯式新多變域測定法 (Duncan's New Multiple Range Test) 比較解凍後精液各性狀間總平均值之差異顯著性 (SAS, 2005)。

## 結果與討論

相對於其他哺乳動物，豬的精子對周圍環境特別敏感（Grossfeld *et al.*, 2008），如培養液 pH、離子強度、離子種類及滲透壓等均會影響其後續功能與儲存時之變化（Watson, 1990）。就提升養豬經濟價值及生產效益而言，精液冷凍保存並維持受胎率及產仔率為急需解決問題；且實施人工授精費用昂貴，因此須進行不同稀釋液儲存效率之相關研究，作為產業之應用參考。

本試驗將解凍後之精液使用 LEY、BTS、Kiev 與 Androhep 等四種不同稀釋液，並在解凍後於 37°C 靜置 7 小時，期間每小時再進行測試；測定項目包括精子存活率、精子總活力、精子快速前進式活力等，試驗結果如表 2 所示。由表 2 之結果顯示，不同精液樣品之精子存活率、精子活力、精子快速前進式活力均呈現顯著差異（ $P < 0.0001$ ）。先進研究證實，公豬精液冷藏及冷凍保存，個體間之精液性狀均呈現顯著差異（Kommisrud *et al.*, 2002; Hernández *et al.*, 2007）。Waterhouse *et al.* (2004) 認為不同樣品之差異，可能係豬隻個體之基因差異，致影響精子及精漿之特性所致。冷凍精液解凍後再以解凍稀釋液稀釋，並於 37°C 靜置 7 小時，結果發現不同時間間距與精液性狀間亦具顯著差異（ $P < 0.0001$ ），此與 Estienne *et al.* (2007) 與 Dube Charlotte *et al.* (2004) 所獲精液性狀隨儲存時間降低之結果一致。不同解凍稀釋液 LEY、BTS、Kiev 與 Androhep 組，精液性狀亦呈現顯著差異（ $P < 0.0001$ ），証實不同解凍稀釋液之影響效果有顯著差異。另外，靜置培養之時間與解凍稀釋液 LEY、BTS、Kiev 與 Androhep 組之精液性狀亦均呈現統計差異（ $P < 0.01$ ），証實不同稀釋液及解凍後靜置培養時間對精液性狀具影響，並有交感之作用。

表 2. 統計模式中精子品質參數之顯著值

Table 2. Levels of significance for the effects included in the statistical model based on sperm quality parameters

Source of variation	Degrees of freedom	Viability	Motility	RPM*
Swine semen sample	7	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Storage Time	7	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Extender	3	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Storage Time × Extender	21	<0.0001	<0.0001	<0.0021

\*RPM, Rapidly progressive motility.

以 LEY、BTS、Kiev 與 Androhep 等不同解凍稀釋液測試解凍後之精液性狀，項目包括精子存活率、精子活力、精子快速前進式活力等，試驗結果如表 3、4、5 所示。表 3、4、5 之結果顯示使用 BTS、Kiev 與 Androhep 等三種解凍稀釋液，其解凍後之精液性狀優於 LEY 解凍稀釋液（ $P < 0.05$ ）。LEY 解凍稀釋液為製作豬冷凍精液之配方，顯然於人工授精時並不適合直接使用此配方作為解凍稀釋液。使用 BTS 解凍稀釋液時，解凍後之精液性狀優於 Kiev 解凍稀釋液（ $P < 0.05$ ）；而 BTS 及 Androhep 解凍稀釋液二者對解凍後之精液性狀，在統計上並無顯著差異。Laforest and Allard (1995) 比較 BTS、MR-A、Androhep 與 Modena 稀釋液，檢測不同稀釋液及冷藏存放

日數，結果精子活力及受胎率並無顯著差異。Huo *et al.* (2002) 選擇 BTS、Kiev、Androhep 與 Zorlesco 等四種稀釋液，比較四種稀釋液對公豬冷藏精液之精子存活率影響，結果存活率高低依序為 Androhep、Zorlesco、BTS、Kiev，可見 BTS 較 Kiev 稀釋液可顯著改善精子之存活率。另有研究發現使用 BTS 稀釋液優於 Kiev，並可使受胎率顯著提高 (Aalbers *et al.*, 1983; Blichfeldt *et al.*, 1988)。Vyt *et al.* (2004) 以 BTS 及 Androhep 稀釋液稀釋公豬精液，結果冷藏保存 7 日後之精子存活率並無統計差異。Estienne *et al.* (2007) 使用短效 BTS 與長效 Androhep-lite 稀釋液，在 17°C 靜置培養 7 日，結果精子之活力亦無顯著差異。Haugan *et al.* (2007) 比較使用長效稀釋液 X-cell™ 與 BTS 短效稀釋液，經稀釋冷藏培養 2 - 3 日，結果人工授精之受胎率並無顯著差異。

表 3. 不同精液稀釋液對豬冷凍精液解凍後精子存活率之影響

Table 3. Effects of different semen extenders on sperm viability in frozen-thawed boar semen

Extender	Post-thaw sperm viability (%)								Mean
	Storage time								
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr	7 hr	
LEY	22.21 <sup>b</sup>	18.32 <sup>c</sup>	16.99 <sup>c</sup>	14.28 <sup>b</sup>	13.58 <sup>c</sup>	13.24 <sup>c</sup>	11.31 <sup>b</sup>	9.61 <sup>b</sup>	14.96 <sup>c</sup>
BTS	59.48 <sup>a</sup>	51.74 <sup>a</sup>	48.27 <sup>a</sup>	39.47 <sup>a</sup>	34.58 <sup>ab</sup>	32.60 <sup>a</sup>	26.78 <sup>a</sup>	21.43 <sup>a</sup>	39.30 <sup>a</sup>
Kiev	55.21 <sup>a</sup>	48.69 <sup>ab</sup>	42.58 <sup>ab</sup>	33.47 <sup>a</sup>	29.30 <sup>a</sup>	24.03 <sup>b</sup>	21.42 <sup>a</sup>	19.93 <sup>a</sup>	34.33 <sup>b</sup>
Androhep	57.16 <sup>a</sup>	44.54 <sup>b</sup>	39.06 <sup>b</sup>	39.24 <sup>a</sup>	35.73 <sup>b</sup>	29.44 <sup>ab</sup>	24.83 <sup>a</sup>	22.34 <sup>a</sup>	36.54 <sup>ab</sup>

Means with different superscripts are different significantly ( $P < 0.05$ ).

表 4. 不同精液稀釋液對豬冷凍精液解凍後精子總活力之影響

Table 4. Effects of different semen extenders on sperm total motility in frozen-thawed boar semen

Extender	Post-thaw sperm total motility (%)								Mean
	Storage time								
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr	7 hr	
LEY	15.17 <sup>c</sup>	12.42 <sup>d</sup>	10.71 <sup>d</sup>	9.72 <sup>b</sup>	8.13 <sup>b</sup>	7.25 <sup>c</sup>	6.01 <sup>c</sup>	4.51 <sup>b</sup>	9.26 <sup>c</sup>
BTS	46.61 <sup>a</sup>	38.90 <sup>a</sup>	33.21 <sup>a</sup>	26.02 <sup>a</sup>	21.28 <sup>a</sup>	17.74 <sup>a</sup>	14.59 <sup>a</sup>	10.52 <sup>a</sup>	26.11 <sup>a</sup>
Kiev	41.31 <sup>b</sup>	30.21 <sup>b</sup>	25.52 <sup>b</sup>	21.79 <sup>a</sup>	17.19 <sup>a</sup>	12.00 <sup>bc</sup>	8.47 <sup>b</sup>	6.01 <sup>ab</sup>	20.31 <sup>b</sup>
Androhep	43.50 <sup>ab</sup>	32.19 <sup>bc</sup>	27.62 <sup>b</sup>	25.43 <sup>a</sup>	21.23 <sup>a</sup>	17.09 <sup>a</sup>	14.21 <sup>a</sup>	10.08 <sup>a</sup>	23.92 <sup>a</sup>

Means with different superscripts are different significantly ( $P < 0.05$ ).

表 5. 不同精液稀釋液對豬冷凍精液解凍後精子快速前進式活力之影響

Table 5. Effects of different semen extenders on rapidly progressive motility (RPM) of sperm in frozen-thawed boar semen

Extender	Post-thaw sperm RPM* (%)								Mean
	Storage time								
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr	5 hr	6 hr	7 hr	
LEY	5.64 <sup>c</sup>	4.84 <sup>c</sup>	4.89 <sup>b</sup>	4.26 <sup>b</sup>	2.15 <sup>b</sup>	2.22 <sup>b</sup>	3.41 <sup>a</sup>	1.40 <sup>a</sup>	3.98 <sup>c</sup>
BTS	26.40 <sup>a</sup>	21.48 <sup>a</sup>	16.83 <sup>a</sup>	12.66 <sup>a</sup>	10.74 <sup>a</sup>	8.06 <sup>a</sup>	6.41 <sup>a</sup>	5.55 <sup>a</sup>	13.52 <sup>a</sup>
Kiev	20.70 <sup>b</sup>	13.76 <sup>b</sup>	11.60 <sup>a</sup>	8.95 <sup>ab</sup>	8.79 <sup>a</sup>	4.99 <sup>ab</sup>	3.84 <sup>a</sup>	2.41 <sup>a</sup>	9.38 <sup>b</sup>
Androhep	26.32 <sup>a</sup>	18.44 <sup>ab</sup>	15.30 <sup>a</sup>	12.28 <sup>a</sup>	10.40 <sup>a</sup>	8.48 <sup>a</sup>	5.94 <sup>a</sup>	6.00 <sup>a</sup>	12.78 <sup>a</sup>

Mean with the different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

\*RPM, Rapidly progressive motility.

BTS 是一種簡單、短效之精液稀釋液，廣泛應用於豬精液之貯存 3 日。BTS 稀釋液中含低濃度之鉀離子，其主要作用為維持儲存期間細胞內鉀離子之生理值 (Johnson *et al.*, 2000)。Kiev 稀釋液自 1965 年研發成功，即廣泛應用於豬精液之稀釋及人工授精上 (Plisko, 1965)。Androhep 之成分較為複雜，含 HEPES 及 BSA 是一種長效精液稀釋液 (5-7 日) (Johnson *et al.*, 2000)，HEPES 為兩性離子緩衝劑，可以捕捉重金屬與維持 pH 穩定 (Crabo *et al.*, 1972)。Dube *et al.* (2004) 之研究發現，Androhep 稀釋液與 BTS 稀釋液相較，可維持較佳的精子前進式活力、活力及存活率，其原因與稀釋液中之 BSA 成分有關。Weitze (1991) 發現，Androhep 稀釋液之 BSA 成分能與細胞漿膜 (包附中節與主要豬精子區) 選擇性結合，中和精子與細菌代謝之副產物。Harrison *et al.* (1982) 亦提出稀釋液添加 BSA 可有效刺激活力，抑制精子脂質過氧化 (Bamba and Sone, 1981; Alvarez and Storey, 1995)。使用 Androhep 稀釋液，並在 12°C 靜置培養 60 小時，仍可達到理想之受胎率 (Althouse *et al.*, 1998)。Waberski *et al.* (1994) 發現將精液以 Androhep 及 BTS 稀釋液稀釋靜置 4 天，結果 Androhep 較 BTS 稀釋液可顯著提高受胎率；但如靜置 2 天，則 Androhep 與 BTS 稀釋液，對精子存活率與精子總活力並無顯著影響 (Dube *et al.*, 2004)。Korniewicz *et al.* (1996) 報告指出，稀釋之公豬精液於 16 - 18°C 靜置培養 5 天，精子活力以 Androhep 優於 Kiev；但 Weitze (1990) 則發現以 Androhep 與 Kiev 稀釋公豬精液，其受胎率並無顯著差異。

由本研究之結果顯示，使用 LEY 解凍稀釋液，對於精子存活率、精子總活力、精子快速前進式活力等，均顯著低於 BTS、Kiev、Androhep 稀釋液 ( $P < 0.05$ )；而 BTS 稀釋液對於精子存活率、精子總活力、精子快速前進式活力等均顯著高於 Kiev 稀釋液 ( $P < 0.05$ )。另外，Androhep 與 BTS 二者對於改善精子存活率、精子總活力、精子快速前進式活力並無顯著差異。本研究之結果可作為豬冷凍精液推廣應用之參考。



## 誌謝

本試驗承農委會科技計畫（97 農科 -2.1.1- 畜 -L3）經費支持，特此致謝，試驗期間並承育種組吳明哲組長商借儀器設備，高雄縣養豬協會蘇朝鵬總幹事提供試驗材料，以及台東種畜繁殖場陳坤照場長、張溪泉主任之協助，謹此一併致謝。

## 參考文獻

- Aalbers, J. G., J. H. M. Rademaker, H. J. G. Groten and L. A. Johnson. 1983. Fecundity of boar semen stored in BTS, Kiev, Zorlesco and Modena extenders under field conditions. *J. Anim. Sci.* 57: 314-315.
- Almid, T. and P. O. Hofmo. 1996. A brief review of frozen semen application under Norwegian AI service conditions. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 169-173.
- Althouse, G. C., M. E. Wilson, C. Kuster and M. Parsley. 1998. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. *Theriogenology* 50: 535-543.
- Alvarez, J. G. and B. T. Storey. 1995. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 334-346.
- Amann, R. P. and D. F. Katz. 2004. Reflections on CASA after 25 years. *J. Androl.* 25: 317-325.
- Bamba, K. and M. Sone. 1981. Factors affecting the quality of boar semen stored by means of dialysis. *J. Reprod. Fertil.* 62: 193-197.
- Barrat, C. L. R., M. J. Tomlinson and I. D. Cooke. 1993. Prognostic significance of computerized motility analysis for in vivo fertility. *Fertil. Steril.* 60: 520-525.
- Blichfeldt, T., T. Almid and S. E. Stavne. 1988. Liquid preservation of boar semen in Kiev or BTS. A field comparison. 11<sup>th</sup> ICAR, Dublin. 3: 231.
- Bolarin, A., J. Roca, H. Rodriguez-Martinez, M. Hernandez, J. M. Vazquez and E. A. Martinez. 2006. Dissimilarities in sows ovarian status at the insemination time could explain differences in fertility between farms when frozen-thawed semen is used. *Theriogenology* 65: 669-680.
- Bwanga, C. O., S. Einarsson and H. Rodriguez-Martinez. 1991. Cryopreservation of boar semen. II: Effect of cooling rate and duration of freezing point plateau on boar semen frozen in mini- and maxi-straws and plastic bags. *Acta. Vet. Scand.* 32: 455-461.
- Cordova-Izquierdo, A., J. H. Oliva, B. Lleó, C. García-Artiga, B. D. Corcuera and J. F. Pérez-Gutiérrez. 2006. Effect of different thawing temperatures on the viability, in vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 ml straws. *Anim. Reprod. Sci.* 92: 145-154.
- Crabo, B. G., K. I. Brown and E. F. Graham. 1972. Effects of some buffers on storage and freezing of boar spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 35: 376-382.
- Dubé, C., M. Beaulieu, C. Reyes-Moreno, C. Guillemette and J. L. Bailey. 2004. Boar sperm storage capacity of BTS and Androhep Plus: Viability, motility, capacitation, and tyrosine phosphorylation. *Theriogenology* 62: 874-886.
- Estienne, M. J., A. F. Haper and L. Jennifer. 2007. Characteristics of sperm motility in boar semen diluted in different extenders and stored for seven days at 18°C. *Reprod. Biol.* 7: 221-231.
- Grossfeld, R., B. Sieg, C. Struckmann, A. Frenzel, W. M. C. Maxwell and D. Rath. 2008. New aspects of boar semen freezing strategies. *Theriogenology* 70: 1225-1233.

- Hammerstedt, R. H., J. K. Graham and J. P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 11: 72-88.
- Harrison, R. A., H. M. Dott and G. C. Foster. 1982. Bovine serum albumin, sperm motility, and the dilution effect. *J. Exp. Zool.* 222: 81-88.
- Haugan, T., A. H. Gaustad, O. Reksen, Y. T. Grohn and P. O. Hofmo. 2007. Fertility results of artificial inseminations performed with liquid boar semen stores in X-Cell™ vs. BTS extender. *Reprod. Dom. Anim.* 42: 94-99.
- Hernández, M., J. Roca, M. A. Gil, J. M. Vázquez and E. A. Martínez. 2007. Adjustments on the cryopreservation conditions reduce the incidence of boar ejaculates with poor sperm freezability. *Theriogenology* 67: 1436-1445.
- Holt, W. V. and A. Medrano. 1997. Assessment of boar sperm function in relation to freezing and storage. *J. Reprod. Fertil. (Suppl)* 52: 213-222.
- Huo, L. J., X. H. Ma and Z. M. Yang. 2002. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar semen during long-term storage. *Theriogenology* 58: 1349-1360.
- Johnson, L. A., J. G. Aalbers, C. M. T. Willems, J. H. M. Rademaker and C. E. Rexroad. 1982. Use of boar spermatozoa for artificial insemination III. Fecundity of boar spermatozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for three days at 18°C. *J. Anim. Sci.* 54: 132-136.
- Johnson, L. A., K. F. Weitze, P. Fiser and W. M. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62:143-172.
- Korniewicz, D., B. Szczesniak-Fabianczyk and Z. Smorag. 1996. The survival rate and fertilizing capacity of boar semen diluted with different diluents. *Reprod. Domest. Anim.* 31: 273-274.
- Kommisrud, E., H. Paulenz, E. Sehested and I. S. Grevle. 2002. Influence of boar and semen parameters on motility and acrosome integrity in liquid boar semen stored for five days. *Acta. Vet. Scand.* 43: 49-55.
- Laforest, J. P. and D. Allard. 1995. Comparison of four extenders for long-term storage of fresh boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 31: 275-276.
- Larsen, L., T. Scheike, T. K. Jensen, J. P. Bonde, E. Ernts and N. H. Hjollund. 2000. Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Hum. Reprod.* 15: 1562-1567.
- Linford, E., F. A. Glover, C. Bishop and D. L. Stewart. 1976. The relationship between semen evaluation methods and fertility in the bull. *J. Reprod. Fertil.* 47: 283-291.
- Marshburn, P. B., D. McIntire, B. R. Carr and W. Byrd. 1992. Spermatozoa characteristics from fresh and frozen donor semen and their correlation with fertility outcome after intrauterine insemination. *Fertil. Steril.* 58: 179-186.
- Plisko, N. T. 1965. Method of prolonging the viability and fertilizing capacity of boar spermatozoa. *Svinovodstvo* 9: 37-41.
- Purdy, P. H. 2006. The post-thaw quality of ram sperm held for 0 to 48 h at 5 degrees C prior to cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 93: 114-123.
- Pursel, V. G. and L. A. Johnson. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *J. Anim. Sci.* 40: 99-102.
- SAS. 2005. SAS® User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Vyt, P., D. Maes, E. Dejonckheere, F. Castryck and A. Van Soom. 2004. Comparative study on five different



- commercial extenders for boar semen. *Reprod. Dom. Anim.* 39: 8-12.
- Waberski, D., K. F. Weitze, C. Lietmann, W. Lubbert zur Lage, F. P. Bortolozzo and T. Willmen. 1994. The initial fertilizing capacity of long term stored liquid boar semen following pre- and postovulatory insemination. *Theriogenology* 41: 1367-1377.
- Waterhouse, K. E., P. M. de Angelis, T. Haugan, H. Paulenz, P. O. Hofmo and W. Farstad. 2004. Effects of in vitro storage time and semen-extender on membrane quality of boar sperm assessed by flow cytometry. *Theriogenology* 62: 1638-1651.
- Watson, P. 1990. Artificial insemination and the preservation of semen. In: Marshall's physiology of reproduction. Lamming G, editor. Edinburgh, Churchill Livingstone. pp. 747-869.
- Weitze, K. 1990. Long-term storage of extended boar semen. In: Procedures for boar semen preservation II, Johnson L. A., Rath D., editors., vol. 1. Berlin, Paul Parey Scientific Publishers. pp. 231-253.
- Westendorf, P., L. Richter and H. Treu. 1975. Zur Tiefgefrierung von Ebersperma Labor-und Besamungsergebnisse mit dem Hulsenberger Pailletten-Verfahren. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.* 82: 261-267.
- Yeste, M., M. Briz, E. Pinart, S. Sancho, N. Garcia-Gil, E. Badia, J. Bassols, A. Pruneda, E. Bussalleu, I. Casas and S. Bonet. 2008. Boar spermatozoa and prostaglandin  $F_{2\alpha}$ . Quality of boar sperm after the addition of prostaglandin  $F_{2\alpha}$  to the short-term extender over cooling time. *Anim. Reprod. Sci.* 108: 180-195.
- Zeng, W. X. and T. Terada. 2001. Protection of boar spermatozoa from cold shock damage by 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Theriogenology* 55: 615-627.

# Study on thawing extenders for boar frozen semen<sup>(1)</sup>

Chia-Chieh Chang<sup>(2)(3)</sup> and Sheng-Yang Wu<sup>(2)</sup>

Received: Mar. 2, 2009 ; Accepted: Jun. 10, 2009

## Abstract

This experiment was conducted to investigate the effects of lactose-egg yolk (LEY), Beltsville thaw solution (BTS), Kiev, Androhep of thawing extenders on the quality of frozen- thawed semen for boars. Semen collected from eight healthy Duroc boars of known reproductive history (2.5 year of age), were retained for sperm cryopreservation. Frozen semen stored in various thawing extenders were examined the percentage of live sperm, total motility and rapidly progressive motility. It showed that the percentage of live sperm, total motility and rapidly progressive motility of LEY extenders were significantly lower than those of BTS, Kiev, Androhep extenders ( $P < 0.05$ ). The percentage of live sperm, total motility and rapidly progressive motility of BTS extenders were significantly ( $P < 0.05$ ). higher than those of Kiev extenders.

Key words : Frozen semen, Thawing extender, Boar.

---

(1) Contribution No. 1526 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

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