

不同稀釋液及去除精漿對山羊精液冷藏保存之影響⁽¹⁾

吳昇陽⁽²⁾ 沈朋志⁽³⁾ 章嘉潔⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：102 年 9 月 25 日；接受日期：103 年 6 月 23 日

摘 要

本研究探討稀釋液及去除精漿對山羊精液冷藏後精液品質之影響。精液採集後區分為有無去除精漿等兩種處理；即分別為未去除精漿且添加脫脂乳粉 (SKM-NW) 或蛋黃稀釋液 (YTF-NW)，以及去除精漿且分別添加脫脂乳粉 (SKM-W) 或蛋黃稀釋液 (YTF-W) 等處理組。試驗一、將稀釋精液冷藏於 4℃ 後，回溫 37℃ 培養 0、2、4 及 6 小時，精液性狀評估結果顯示，未去除精漿之精液添加脫脂乳 (SKM-NW) 或蛋黃 (YTF-NW) 之稀釋液，對精子活力、前進式活力及頭帽完整性皆無顯著差異，而去除精漿之精液添加脫脂乳 (SKM-W) 或蛋黃 (YTF-W) 之稀釋液於冷藏 4℃ 後，回溫 37℃ 培養 4 及 6 小時，在精子活力、前進式活力及頭帽完整性則呈顯著差異 ($P < 0.05$)。試驗二、去除精漿對山羊精液冷藏 3 日後之精子活力、前進式活力及精子頭帽完整性之影響，結果顯示冷藏在 4℃ 下經 0、1、2 及 3 日，各處理組之精子活力、前進式活力及頭帽完整性均無顯著差異，而冷藏在 4℃ 下 3 日，去除精漿之精液添加脫脂乳 (SKM-W) 或蛋黃 (YTF-W) 之稀釋液，在精子活力、前進式活力及頭帽完整性皆呈顯著差異。去除精漿之精液添加脫脂乳粉 (SKM-W) 冷藏者與其他組比較，對精子之保護力較差。結論顯示，精液去除精漿並添加以脫脂乳粉為基礎成分之稀釋液 (即 SKM-W 處理組)，較不適用於山羊精液之冷藏保存。

關鍵詞：山羊精液、稀釋液、冷藏保存。

緒 言

家畜精液保存技術是隨著人工授精技術廣泛應用而產生的，原理是利用降低或抑制精子新陳代謝而達到延長精子在體外存活之時間。精液在低溫和冷凍儲存過程中，有很多因素會影響精液之保存效果，如稀釋液成分，因此要尋找合適的稀釋液配方和冷藏條件，才能從根本上解決保存山羊精液的應用與推廣問題。學者研究在低溫條件下，可以有效地降低精子的代謝活力，減緩精子的能量損耗，從而延長精子的存活時間，而在室溫條件下精子的活動明顯增加，能量消耗過快，因此縮短其存活之時間 (Paulenz *et al.*, 2002)。但隨著溫度的降低，精子之細胞膜組成分中之磷脂質，由液相轉變為膠態，因此細胞膜的通透性會增加，導致精子內部的陽離子和酶滲漏，以及控制細胞膜的酶活性和擴散能力降低，影響精子的獲能、頭帽反應及造成活力嚴重衰退 (De Leeuw *et al.*, 1991)。考量在田間之應用，而冷藏時間延長更有利於人工授精應用，因此探討在冷藏保存後回溫之精液品質，在冰箱 4℃ 條件下保存精液是非常必要的；只需使用普通冰箱，對於一般羊場無需增加設備及人力，便可提升優良種畜之利用，擴展授精範圍，具有實質的應用前景。目前山羊精液之稀釋液可區分為含脫脂乳粉及蛋黃為主要成分之稀釋液 (Leboeuf *et al.*, 2000; Purdy, 2006)，且二者在低溫下都具有安定精子細胞膜的作用 (De Leeuw *et al.*, 1991)。本試驗以脫脂乳粉或蛋黃為冷藏稀釋液之成分，探討其成分與去除精漿與否對精液冷藏保存的效果，以尋求適宜山羊精液保存之冷藏稀釋液配方。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2121 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所臺東種畜繁殖場。

(3) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

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

材料與方法

I. 山羊精液來源

本試驗之山羊精液，分別採自 5 頭 2 – 3 歲努比亞山羊年齡，而精液之收集則於繁殖季節之 10 – 12 月份，待公羊駕乘母羊同時使用人工陰道 (artificial vagina) 進行採集。

II. 精漿之去除

將利用人工陰道採集之精液混合後置於 15 mL 離心管內，並添加總精液量 10 倍之精漿去除操作液 (係修改自 Leboeuf *et al.* (2000)、Corteel (1974) 之 Krebs-Ringer-Glucose Physiological solution) 之配方，其成分如表 1，經充分混合後，以 500 xg 離心 10 min.，經去除上層精漿後，再重覆上述步驟乙次，以完成精漿之去除。

表 1. 精漿操作液配方

Table 1. The composition of goat semen plasma operating extender

Composition	0.9% NaCl	1.15% KCl	0.61% CaCl ₂	2.11% KH ₂ PO ₄	3.82% MgSO ₄ •7H ₂ O	5.34% glucose anhydrate	phosphate buffer (pH 7.4)
Volume (mL)	100	4	3	0.4	1	4.5	12

III. 山羊精液冷藏稀釋液之配製

本試驗所使用於山羊精液冷藏保存之稀釋液配方中，以脫脂乳粉 (skimmed-milk extender; SKM) 為基礎成分之稀釋液係依據 Corteel (1974) 所使用者；而以蛋黃為基礎成分之稀釋液 (Egg yolk-tris-fructose extender; YTF) 則依據 Evans and Maxwell (1987) 所使用者，此兩種稀釋液之組成分詳如表 2 所示。

表 2. 山羊精液冷藏稀釋液配方 SKM 及 YTF 之組成分

Table 2. The components of SKM and YTF-base extenders for goat semen

Components	SKM	YTF
Egg yolk (%)	0	2.5
Skim milk powder (g)	10	0
Fructose (g)	0	0.5
Glucose anhydrate (g)	0.194	0
Citric acid (monohydrate) (g)	0	1.99
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (g)	0	3.634
Streptomycin (μg/ml)	2.5	2.5
Crystalline penicillin (IU)	2,500	2,500
Distilled water (mL)	100	100
References*	(1)	(2)

SKM: Skimmed-milk extender; YTF: Egg yolk-tris-fructose extender.

* (1): Corteel (1974); (2): Evans and Maxwell (1987).

IV. 山羊冷藏精液之稀釋、冷藏降溫及回溫

將採集之公羊精液先予以均分為兩組，其中一組分別直接添加稀釋液 SKM (SKM-NW 試驗組) 或 YTF (YTF-NW 試驗組) 予以混勻，另一組則去除精漿後，再分別添加 SKM (SKM-W 試驗組) 及 YTF

(YTF-W 試驗組) 稀釋液。各組稀釋液添加量係以調整精子濃度至 5×10^8 sperm/mL 為原則，精液與不同稀釋液經充分混合後，靜置於 4°C 冰箱內降溫 2 小時之後，試驗一、將本試驗各處理組置 37°C 培養箱 (NU-3500, NUAIR) 回溫培養 0、2、4 及 6 小時，然後進行各項精液品質性狀評估；試驗二、將各處理組於 4°C 冷藏 0、1、2 及 3 日，並分別於 37°C 回溫後立即進行各項精液品質性狀評估。

VI. 精液品質性狀之評估

(i) 精子活力及前進式活力之評估

將新鮮採集及冷藏不同時段後之精液以 37°C 回溫後，置於莫克精蟲計數盤 (Makler counting chamber) (Makler, 1978, Germany) 中，並於顯微鏡下搭配電腦輔助影像分析系統 (computer-assisted sperm motility analysis; CASA) 之精液分析儀 (VideoTesT-Sperm 2.1)，進行精子活力 (sperm total motility; TM) 及精子前進式活力 (sperm progressive motility; PM) 等項目之評估。

(ii) 精子頭帽完整性之評估

精子頭帽完整性之評估係修正自 Fazeli *et al.* (1997) 所使用之方法，即吸取 30 μ L 已回溫之各處理組精液塗抹於載玻片上，於空氣中自然陰乾後，將玻片置入甲醇液中固定 10 min，其後待精液樣品陰乾後再取 30 μ L 含螢光素異硫氰酸鹽結合花生凝集素 (100 μ g/mL) (fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin, FITC-PNA) (Sigma Chemical Co., St, Louis, MO) 之 PBS 滴入精液樣品中，並置於 37°C 含 5% CO₂ 及 100% 濕度條件之培養箱中進行 30 min 之染色；最後再以 PBS 沖洗載玻片以去除未與精子結合之 FITC-PNA，並於空氣中乾燥後封片而完成。已完成染色之精液樣品，置於螢光顯微鏡下以激發光波長為 480 nm、射出光波長為 530 nm 之紫外光於 100 倍放大倍率條件下隨機取數個視野 (且至少計數 100 個精子以上之樣品數) 觀察之。精子頭帽完整性之判定方法 (Fazeli *et al.*, 1997)，依 (1) 精子頭帽外廓顯現密集明亮螢光者判定為頭帽完整之精子；(2) 精子頭帽外廓部份顯現螢光者判定為頭帽部分受損之精子；(3) 精子頭帽外廓未顯現螢光者判定為頭帽完全受損之精子。

VI. 統計分析

本試驗各處理組之冷藏精液回溫後之精子活力及前進式活力所得之試驗數據，利用 SAS (statistical analysis system, SAS 9.1, 2005) 統計套裝軟體以一般線性模式 (general linear model, GLM) 程序進行變異分析，並以鄧肯氏多變域測定法 (Duncans multiple ranges test) 比較各處理組之差異顯著性。

結果與討論

本研究探討稀釋液及離心去除精漿與否，對山羊精液冷藏後精液品質之影響。試驗一、探討稀釋液成分及精漿去除對山羊精液冷藏後精子活力、前進式活力及精子頭帽完整之影響。本試驗評估之精液源自努比亞山羊，在未去除精漿條件下，以脫脂乳 (SKM-NW) 或蛋黃 (YTF-NW) 為基礎成分之稀釋液，以及在去除精漿後，利用脫脂乳 (SKM-W) 或蛋黃 (YTF-W) 為基礎成分之稀釋液所配製之 4 組處理方式，進行冷藏精液回溫後不同時距之精子活力、前進式活力及頭帽完整性評估 (表 3)。結果顯示，精液冷藏保存 4°C，之後於 37°C 回溫培養 0、2、4 及 6 小時，未去除精漿之精液以脫脂乳 (SKM-NW) 或蛋黃 (YTF-NW) 之稀釋液處理者，稀釋後精子活力、前進式活力及頭帽完整性皆無顯著差異。精液冷藏保存 4°C，之後於 37°C 回溫培養，去除精漿之精液以脫脂乳 (SKM-W) 或蛋黃 (YTF-W) 之稀釋液處理組，培養 4 及 6 小時觀察其精子活力、前進式活力及頭帽完整性均呈顯著差異 ($P < 0.05$)；其中去除精漿之精液以脫脂乳 (SKM-W) 稀釋後冷藏，並於 37°C 回溫培養 4 及 6 小時，精子活力、前進式活力及頭帽完整性均表現較差。試驗二、稀釋液成分及去除精漿對山羊精液在 4°C 冷藏 3 日之精液性狀之評估，利用 SKM-NW、YTF-NW、SKM-W、YTF-W 等四種處理所配製之冷藏精液，於冷藏 1 至 3 日之精子活力、前進式活力及精子頭帽完整之結果分別如表 4 所示，其中去除精漿之精液於 4°C 冷藏 0、1 及 2 日，結果各處理組之活力、前進式活力及精子頭帽完整性均無顯著差異，而精子於 4°C 冷藏 3 日，去精漿之精液以脫脂乳 (SKM-W) 或蛋黃 (YTF-W) 稀釋液處理組，在精子活力、前進式活力及頭帽完整性於 37°C 回溫後觀察呈顯著差異 ($P < 0.05$)。

本實驗評估精子存活時間及精子活力、前進式活力及頭帽完整性等之相關性狀均與受精能力密切相關，而為評定精液品質的重要指標之一，也是鑑定精液稀釋液對精液處理效果的重要參考依據。在山羊冷藏或冷凍精液之製作過程中，添加含脫脂乳粉或蛋黃之稀釋液為普遍之步驟，惟不同於其他家畜者，山羊之精漿中有源自尿道球腺分泌物中之蛋黃凝集酵素 (egg yolk coagulating enzyme, EYCE) 或稱之為 BUSgp60 (Leboeuf *et al.*, 2000)；此酵素會將蛋黃中的卵磷脂分解產生溶血卵磷脂 (lysolecithin) 或分解脫脂乳粉中之三酸甘油酯而產生油酸 (oleic acid)，而造成稀釋後精液品質之降低，因此建議製作山羊冷藏或冷凍精液前宜將精漿予以去除 (Aamdal *et al.*, 1965; Ritar and Salamon, 1982; Leboeuf *et al.*, 2000)。然在本研究探討稀釋液成分及去除精漿對奴比亞山羊精液冷藏後精液品質影響性之評估方面，顯示精液於 4°C 冷藏保存後，再於 37°C 回溫培養 6 小時，結果未去除精漿之精液以脫脂乳 (SKM-NW) 或蛋黃 (YTF-NW) 之稀釋液稀釋後，在精子活力、前進式活力及頭帽完整性等皆無顯著差異；而去除精漿之精液以脫脂乳 (SKM-W) 或蛋黃 (YTF-W) 之稀釋液處理等兩組相較，其精子活力、前進式活力及頭帽完整性等於 37°C 回溫培養 4 及 6 小時均呈顯著差異 ($P < 0.05$)；其中以 SKM-W 組冷藏後 37°C 回溫培養後觀察精子活力、前進式活力及頭帽完整性表現較差。此等結果說明，利用 SKM-NW 及 YTF-NW 為稀釋液時，未去除精漿似不影響冷藏之山羊精液的精液品質。但利用 SKM 為稀釋液時，精漿之去除則會降低冷藏之山羊精液的精液品質。有學者認為精漿之去除與否，並不會影響冷藏與冷凍山羊精液之精液品質 (楊等 1999; Azeredo *et al.*, 2001)。研究亦認為山羊精液稀釋前去除精漿之離心處理，可能會對精子造成機械性之傷害，使精液之固有物質喪失後，損傷效應更顯著，因此認為利用不去除精漿之精液進行冷凍保存反而有較佳之解凍後精液品質 (Gonzales-Stagnaro, 1975)。此外，研究發現山羊精漿中仍存有抑制蛋黃凝集酵素，造成蛋黃或脫脂乳粉之分解，目前仍未知具體成分及相關作用機制 (Pellicer-Rubio, 1995; 1997)，而使未去除精漿之山羊精液於冷凍後仍具有高精液品質之可能 (Corteel, 1980; Aboagla and Terada, 2004)。雖然多數學者提出精漿去除可顯著提高山羊冷藏或冷凍之精液品質 (Ritar and Salamon, 1982; Memon *et al.*, 1985; Leboeuf *et al.*, 2000; Choe *et al.*, 2006)，因此迄今針對山羊精液之冷凍步驟中是否須去除精漿之操作仍有爭議。惟本研究中以 SKM 為稀釋液時，精漿之去除會造成冷藏山羊精液品質之降低，其原因仍未知，尚待進一步闡明。

本研究中精液在冷藏 3 日後之精子活力、前進式活力及精子頭帽完整性之結果，分別如表 4 所示。精液於 4°C 冷藏 0、1 及 2 日，各處理組之精子活力、前進式活力及精子頭帽完整性均無顯著差異；而精液於 4°C 冷藏 3 日後，去除精漿之精液以添加含蛋黃 (YTF-W) 之稀釋液稀釋後，其回溫後之精子活力、前進式活力及頭帽完整性均顯著優於添加含脫脂乳 (SKM-W) 之稀釋液組 ($P < 0.05$)。在冷卻降溫及體外培養過程中將造成精子之沉澱，而使精子代謝所產生之代謝廢物無法排除而蓄積於周圍環境中 (冷藏液或培養液中)，進而傷害精子之品質 (Nagy *et al.*, 2002)。Kasimanickam *et al.* (2007) 研究綿羊精液在冷藏 2 日後回溫檢測精子之前進式活力的結果指出，蛋黃為主之稀釋液的冷藏效果顯著優於脫脂乳稀釋液。Paulenz *et al.* (2002) 之研究，亦指出綿羊精液冷藏 30 小時，結果以蛋黃稀釋液較脫脂乳稀釋液對精子有較佳保護能力，其測定項目包含精子活力、精細胞膜完整性和精子之獲能反應等。Bucak *et al.* (2009) 之研究，比較有、無去精漿精液，使用蛋黃稀釋液進行冷凍保存，結果解凍後對精子之參數並無影響。據學者之研究，蛋黃添加濃度 1.5 至 50% 之比例不等 (Salamon and Maxwell, 1995)，且蛋黃濃度與冷凍—解凍後的山羊精子活力有關，採用低濃度蛋黃 (1.5%) Tris- 稀釋液而未去除精漿，結果並無不良影響 (Ritar and Salamon, 1982)。Pellicer-Rubio *et al.* (1997) 之研究，顯示山羊精液在冷凍保存過程中，精液稀釋液含蛋黃濃度為 2.5% 時，可保持精子活力佳及形態受損減少，此可能與使用較低濃度比例之蛋黃添加稀釋液，所含水解有害物質釋放減少所致，而本實驗採用 2.5% 蛋黃濃度之冷藏保護效果亦有一致之結果。

以脫脂乳稀釋液稀釋去除精漿 (SKM-W) 之山羊精子，經冷藏 3 日後之精子活力或前進式活力最差，推測可能於離心去除精漿過程中，對精子造成傷害；而蛋黃稀釋液則有良好冷藏效果。多數學者使用蛋黃稀釋液稀釋精液，並比較精液有無去除精漿之影響，結果受胎率並無顯著差異 (Ritar *et al.*, 1990; Salvador *et al.*, 2005; Dorado *et al.*, 2007; Bispoa *et al.*, 2011)，而本實驗採用 2.5% 蛋黃濃度之稀釋液且無論去除精漿均有一致性結果。Paulenz *et al.* (2002) 之研究中，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活力，且精子頭帽完整性、膜完整性均較佳。Tris 在稀釋液中具緩衝作用，可調節精液稀釋液 pH 值，有利於精子生存與恆定；以及減少對精子的代謝和運動能力等影響。故綜合整體之效應，精液去除精漿並添加脫脂乳粉為基礎成分之稀釋液 (即 SKM-W 處理組) 較不適用於山羊精液之冷藏保存，而本研究之結果可提供山羊精液低溫冷藏保存技術之參考。

表 3. 稀釋液及精漿去除對山羊精液冷藏後在 37°C 培養不同時間，對精子活力、前進式活力及頭帽完整性影響

Table 3. The effects of extender and removal of seminal plasma on motility, progressive motility and acrosome integrity of goat sperm stored at 4°C and different incubation times at 37°C.

Treatment*	Incubation time			
	0 h	2 h	4 h	6 h
Motility				
SKM-NW	85.5 ± 5.3 ^a	79.7 ± 5.1 ^{ab}	76.2 ± 2.7 ^{ab}	74.2 ± 3.1 ^a
YTF-NW	85.8 ± 5.0 ^a	85.0 ± 4.2 ^a	79.9 ± 2.4 ^a	68.8 ± 3.8 ^{ab}
SKM-W	78.4 ± 8.5 ^a	69.6 ± 6.7 ^b	67.1 ± 5.8 ^b	59.5 ± 7.4 ^b
YTF-W	81.2 ± 5.6 ^a	78.1 ± 4.1 ^{ab}	77.7 ± 4.6 ^a	76.8 ± 3.5 ^a
Progressive motility				
SKM-NW	66.1 ± 4.3 ^a	61.4 ± 3.1 ^a	60.0 ± 3.2 ^a	47.3 ± 4.5 ^{ab}
YTF-NW	68.6 ± 3.9 ^a	65.0 ± 3.2 ^a	56.9 ± 5.5 ^a	48.6 ± 3.8 ^a
SKM-W	60.5 ± 7.4 ^a	50.5 ± 5.4 ^b	45.1 ± 3.8 ^b	38.5 ± 5.6 ^b
YTF-W	61.9 ± 5.8 ^a	59.8 ± 4.5 ^{ab}	59.6 ± 3.9 ^a	51.8 ± 4.1 ^a
Intact acrosome (%)				
SKM-NW	73.5 ± 4.7 ^a	70.3 ± 7.4 ^a	63.2 ± 6.9 ^a	56.5 ± 4.2 ^{ab}
YTF-NW	74.4 ± 6.5 ^a	63.7 ± 7.6 ^a	60.6 ± 5.6 ^a	58.9 ± 5.1 ^a
SKM-W	70.5 ± 7.2 ^a	65.8 ± 7.5 ^a	55.6 ± 5.3 ^b	53.5 ± 6.5 ^b
YTF-W	73.5 ± 4.2 ^a	70.0 ± 5.7 ^a	65.2 ± 6.3 ^a	58.7 ± 7.7 ^a

^{a, b} Means with different superscripts in the same column are significantly different (P < 0.05).

* SKM: Skimmed-milk extender. YTF: Egg yolk-tris-fructose extender. W: Seminal plasma removed. NW: Seminal plasma intact.

表 4. 稀釋液及精漿去除對山羊精液 4°C 冷藏 3 日之精子活力、前進式活力及頭帽完整性之影響

Table 4. Effects of extender and removal of seminal plasma on the motility, progressive motility and acrosome integrity of goat sperm during liquid storage at 4°C for 3 day

Treatment*	Incubation time			
	day 0	day 1	day 2	day 3
Motility				
SKM-NW	84.8 ± 2.3 ^a	77.4 ± 6.7 ^a	75.6 ± 5.9 ^a	68.0 ± 8.1 ^a
YTF-NW	82.9 ± 3.4 ^a	69.0 ± 7.6 ^a	66.6 ± 9.7 ^a	63.7 ± 3.9 ^{ab}
SKM-W	78.3 ± 4.4 ^a	69.4 ± 4.2 ^a	65.4 ± 6.5 ^a	55.1 ± 7.6 ^b
YTF-W	83.2 ± 2.0 ^a	74.6 ± 5.6 ^a	69.6 ± 5.8 ^a	69.8 ± 5.8 ^a
Progressive motility				
SKM-NW	65.1 ± 7.8 ^a	57.4 ± 5.5 ^a	49.7 ± 9.2 ^a	43.4 ± 8.5 ^a
YTF-NW	62.4 ± 6.3 ^a	49.1 ± 5.6 ^a	43.8 ± 8.1 ^a	39.1 ± 7.3 ^{ab}
SKM-W	65.6 ± 2.1 ^a	51.5 ± 7.5 ^a	44.5 ± 4.9 ^a	34.9 ± 6.1 ^b
YTF-W	64.6 ± 5.1 ^a	48.2 ± 9.2 ^a	48.4 ± 9.8 ^a	47.6 ± 6.4 ^a
Intact acrosome (%)				
SKM-NW	73.5 ± 5.6 ^a	70.2 ± 3.9 ^a	66.6 ± 5.2 ^a	63.4 ± 3.6 ^a
YTF-NW	71.7 ± 4.1 ^a	66.5 ± 7.3 ^a	61.8 ± 4.2 ^a	56.5 ± 7.7 ^a
SKM-W	67.9 ± 4.6 ^a	65.5 ± 7.6 ^a	60.0 ± 5.6 ^a	53.8 ± 8.7 ^b
YTF-W	72.7 ± 7.0 ^a	67.6 ± 4.5 ^a	64.3 ± 8.4 ^a	57.9 ± 3.9 ^a

^{a, b} Means with different superscripts in the same columns are significantly different (P < 0.05).

* SKM: Skimmed-milk extender. YTF: Egg yolk-tris-fructose extender. W: Seminal plasma removed. NW: Seminal plasma intact.

誌 謝

本試驗期間承蒙臺東種畜繁殖場孫明德、陳威成及陳正宏等現場同仁之協助，特此誌謝。

參考文獻

- 楊鎮榮、黃政齊、謝明江。1999。稀釋與冷凍處理過程對山羊冷凍精液解凍後存活率與活力之影響。畜產研究 32：267-277。
- Aamdal, J., O. Lyngest and K. Fossum. 1965. Toxic effect of lysolecithin on sperm. Nord. Vet. Med. 17: 633-634.
- Aboagla, E. M. and T. Terad. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. Theriogenology 62: 1160-1172.
- Azeredo, G. A., C. R. Esper and K. T. Resende. 2001. Evaluation of plasma membrane integrity of frozen-thawed goat spermatozoa with or without seminal plasma. Small Rumin. Res. 41: 257-263.
- Bispoa, C. A. S., G. Pugliesi, P. Galvão, M. T. Rodrigues, P. G. Kerb, B. Filgueiras and G. R. Carvalhob. 2011. Effect of low and high egg yolk concentrations in the semen extender for goat semen cryopreservation. Small Rumin. Res. 100: 54-58.
- Bucak, M. N., S. Sariozkan, P. B. Tuncer, P. A. Ulutas and H. A. Akcadag. 2009. Effects of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. Small Rumin. Res. 81: 90-95.
- Choe, C. Y., J. G. Kim, S. R. Cho, D. S. Son, Y. K. Kim, S. Balasubramanian, S. Y. Choe and G. J. Rho. 2006. Influence of seasons, extenders, slow and rapid freezing on seminal characters in Korean native bucks. Reprod. Domest. Anim. 41: 55-60.
- Corteel, J. M. 1974. Viabilité des spermatozoïdes de bouc conservés et congelés avec ou sans leur plasma séminal: effet du glucose. Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 14: 741-745.
- Corteel, J. M. 1980. Effect du plasma séminal sur la survie et la fertilité des spermatozoïdes conservés in vitro. Reprod. Nutr. Dev. 68: 1111-1123.
- De Leeuw, F. E., B. Colenbrander and A. J. Verkleij. 1991. Effects of various bull semen extenders on plasma membrane integrity. Cryobiology 28:45. (Abst.)
- Dorado, J., I. Rodriguez and M. Hidalgo. 2007. Cryopreservation of goat spermatozoa: comparison of two based extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. Theriogenology 68: 168-177.
- 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.
- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. Dilution of semen. In: Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths. ed. Butterworths. Canberra. Sydney. pp.107-117.
- Gonzales-Stagnaro, C. 1975. Insemination artificial en cabras con semen congelado. Zootecnia 24: 151-163.
- Kasimanickam, R., V. Kasimanickam, K. D. Pelzer and J. J. Dascanio. 2007. Effect of breed and sperm concentration on the changes in structural, functional and motility parameters of ram-lamb spermatozoa during storage at 4 degrees C. Anim. Reprod. Sci. 101: 60-73.
- Leboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. Anim. Reprod. Sci. 62: 113-141.
- Memon, M. A., K. N. Bretzlaff and M. S. Ott. 1985. Effect of washing on motility and acrosome morphology of frozen-thawed goat spermatozoa. Am. J. Vet. Res. 46: 473-475.
- Nagy, S., G. Sinkovics and A. Kovacs. 2002. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. Anim. Reprod. Sci. 70: 283-286.

- Paulenz, H., L. Söderquist, R. Pérez-Pé and K. A. Berg. 2002. Effect of different extenders and storage temperatures on sperm viability of liquid ram semen. *Theriogenology* 57: 823-836.
- Pellicer-Rubio, M. T. 1995. Purificación y caracterización del componente de la secreción bulbouretral de macho cabrío implicado en el deterioro de la calidad de los espermatozoides diluidos en leche. In: *Tesis de Licenciatura*. Universidad de Murcia. p.200.
- Pellicer-Rubio, M. T., T. Magallon and Y. Combarnous. 1997. Deterioration of goat sperm viability in milk extenders is due to a Bulbourethral -Kilodalton glycoprotein with triglyceride lipase activity. *Biol. Reprod.* 57: 1023-1031.
- Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Rumin. Res.* 63: 215-225.
- Ritar, A. J. and S. Salamon. 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 35: 305-312.
- Ritar, A. J. and S. Salamon. 1983. Fertility of fresh and frozen-thawed semen of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.* 36: 49-59.
- Ritar, A. J., P. D. O. Ball and P. J. May, 1990. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reprod. Fertil. Dev.* 2: 377-384.
- 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.
- Salvador, I., M. P. Viudes-de-Castro, J. Bernacer, E. A. Gomez and M. A. Silvestre. 2005. Factors affecting pregnancy rate in artificial insemination with frozen semen during non-breeding season in Murciano-Granadina goats: a field assay. *Reprod. Domest. Anim.* 40: 526-529.
- SAS. 2005. User's Guide: Statistics, Version 9.1 Edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC. USA.

Effects of different extenders and removal of seminal plasma on goat semen quality during storage at 4°C ⁽¹⁾

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

Received: Sep. 25, 2013; Accepted: Jun. 23, 2014

Abstract

The purposes of this study were to evaluate the effects of extender and centrifugation and removal of seminal plasma on semen quality. The ejaculates were pooled and divided into two aliquots, the semen plasma of one aliquot was remained intact and diluted with for skimmed-milk based (SKM-NW) or egg yolk based extender (YTF-NW) and for the other aliquot the semen plasma was removed and then diluted with skimmed-milk based (SKM-W) or egg yolk based extender (YTF-W), respectively. In experiment 1, results showed that there were no differences in sperm motility, progressively motility and acrosome integrity among the SKM-NW and YTF-NW stored at 4°C and then incubated at 37°C after 0, 2, 4 and 6 h. However, there were significant ($p < 0.05$) difference on the sperm motility, progressively motility and acrosome integrity between the SKM-W and YTF-W stored at 4°C and then incubated at 37°C for 4 and 6 h ($P < 0.05$). In experiment 2, results showed that there were no differences in sperm motility, progressive motility and acrosome integrity between the SKM-NW and YTF-NW stored during 0, 1, 2 and 3 day at 4°C. However, the SKM-W treatment had lower ($P < 0.05$) sperm motility, progressive motility and acrosome integrity than that of the YTF-W during storage at 4°C for 3 days. In conclusion, SKM-W was not suitable for the storage of goat semen at 4°C.

Key words: Goat semen, Extenders, Refrigeration.

(1) Contribution No. 2121 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

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

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