

玻璃化冷凍保護劑與冷凍解凍程序對山羊胚 解凍後續發育能力之影響⁽¹⁾

康定傑⁽²⁾⁽⁶⁾ 曾楷屏⁽⁴⁾ 黃曲佑⁽²⁾ 陳裕信⁽³⁾ 曲鳳翔⁽³⁾ 林信宏⁽⁴⁾ 邢相媛⁽⁵⁾ 沈朋志⁽⁶⁾⁽⁷⁾

收件日期：111 年 6 月 13 日；接受日期：112 年 3 月 25 日

摘 要

本研究之目的係比較二種胚玻璃化冷凍劑組成及冷凍程序，對不同發育階段山羊胚經冷凍解凍後之體內及體外發育能力之影響。試驗共觀察到 99 個黃體，回收 71 個胚（桑葚胚 18 個，囊胚 36 個，發育中止胚 17 個），分為兩組進行，每組之冷凍程序各含兩個階段，第一組為 ethylene glycol (EG)+ dimethyl sulfoxide (DMSO) 與 0.5 M 海藻糖 (trehalose) 組（7 個桑葚胚，15 個囊胚）：第一階段冷凍配方為 10% EG，10% DMSO，平衡時間為 5 min；第二階段 16.5% EG、16.5% DMSO 及 0.5 M trehalose，平衡時間 45 s。第二組方法為 EG + PG 組（11 個桑葚胚，21 個囊胚）：第一階段為 2% EG、2% 丙二醇 (propylene glycol, PG) 0.4 M 海藻糖，平衡時間 12 min；第二階段為與 17.5% EG、17.5% PG 及 0.4 M 海藻糖，平衡時間 30 s 結果顯示 EG + PG 組於囊胚解凍後於 38.8℃、5% CO₂ 及 100% 飽和濕度條件之培養箱中進行培養 2 h 後形態恢復率顯著較 EG + DMSO 組佳 (76.0 ± 2.0% vs. 66.7 ± 23.6%; P < 0.05)；另外，以 EG + PG 組處理之桑葚胚及囊胚後續經胚移置後第 45 天之懷孕率 (66.7 ± 28.8% vs. 66.7 ± 57.7%) 及胚移置效率 (60.0 ± 15.0% vs. 55.6 ± 19.2%) 則無顯著差異。綜合試驗結果顯示以 EG + PG 組處理冷凍囊胚，解凍後經 2 h 培養的恢復率較 EG + DMSO 組為佳；惟經 EG + PG 組處理之桑葚胚及囊胚於移置後 45 天之懷孕率及移置胚發育率則無差異。EG + PG 之處理方法及策略可替代高毒性 DMSO 之使用，並可用於桑葚胚及囊胚之冷凍及胚移置。

關鍵詞：胚移置、胚玻璃化冷凍、山羊。

緒 言

在輔助生殖技術 (assisted reproductive technology, ART) 中，胚冷凍保存可讓胚的利用最大化。但在胚冷凍保存過程中，對胚造成諸多的傷害，直接影響到胚冷凍解凍後之存活率，其中最具破壞性的是細胞內冰晶的形成 (Kasai, 1996, 2002)。為防止細胞內冰晶形成的第一個策略便是使用較低濃度的冷凍保護劑和較長的降溫時間，這種慢速冷凍方法已被證實對多種哺乳動物的胚有效。在早期使用慢速冷凍方式進行胚冷凍時，最常使用的冷凍保護劑是蔗糖、甘油和丙二醇 (Lassalle *et al.*, 1985)；然而，慢速冷凍仍然很難避免冰晶形成造成的傷害，且長時間將胚儲存於液態氮中 (Hartshorne *et al.*, 1991; Menezo *et al.*, 1992)，增加了污染以及氧化傷害的可能性。Rall and Fahy (1985) 首創玻璃化冷凍方法，試驗以 20.5% (w/v) dimethyl sulfoxide 搭配 15.5% (w/v) 乙醯胺 (acetamide)、10% (w/v) propylene glycol 及 6% (w/v) EG 為冷凍保護劑，以快速降溫方式 (2,500°C min⁻¹) 達到減少冰晶形成，確保胚在冷凍過程中冰晶傷害可降到最低。玻璃化冷凍複雜之處在於使用高濃度冷凍保護劑時，其毒性會對胚造成傷害。為了防止這種情況，通常使用兩步驟平衡，胚先在較低濃度 4 – 10% 冷凍保護劑溶液中平衡，然後將胚移至高濃度 25 – 35% 冷凍保護劑中，經 30 – 60 s 短暫暴露後旋即置入液態氮中冷凍。玻璃化冷凍過程中胚平衡時間取決於冷凍保護劑濃度和溫度，因為冷凍保護劑的滲透性和毒性受溫度的影響。因此胚冷凍策略即為影響胚解凍後存活率與發育能力的關

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2741 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) 國立中興大學生物醫學研究所。

(6) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(7) 通訊作者，E-mail: pcshen@mail.npust.edu.tw。

鍵 (Menezo *et al.*, 1992)。本研究以不同冷凍保護劑種類、濃度搭配、平衡時間及解凍溫度，並以胚移置來驗證新策略對山羊桑椹胚及囊胚玻璃化冷凍解凍後之胚移置效率。

材料與方法

I. 試驗動物申請

試驗所使用之動物均依法申請，經行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所實驗動物照護及使用小組審查通過，核准編號畜試恆動字第 110003(LRI IACUC 110003)。

II. 供胚、受胚母羊及發情同期化處理

本試驗使用之供胚母羊為恆春分所自行繁殖，年齡介於 2 至 3 歲齡之臺灣黑山羊恆春品系，每頭羊至少經過 1 個產次。試驗使用 10 頭供胚母羊，進行 15 頭次取胚手術，其中 5 頭取胚 2 次。發情同期化處理使用 CIDR® (controlled internal drug release, CIDR®, EAZI-breed, Rydalmere, Australia)，搭配孕馬血清激性腺素 (pregnant mare's serum gonadotropin, PMSG, Prospec-Tany, Israel) 及 前列腺素 F2α (prostaglandin F2α, PGF2α, analogue cloprostenol, Estrumate, Vet Pharma Friesoythe GmbH) 進行。CIDR® 植入陰道為第 0 天，第 9 天肌肉注射 PGF2α (5.3 mg/0.5 mL) 及 PMSG 700 IU，第 11 天移除 CIDR®，並於 CIDR® 移除後 12 小時觀察母羊發情狀況，若有發情徵候即移入公羊進行複次配種 (第一次成功配種 6 h 後再進行第二次配種)。配種後第 19 天進行外科手術胚收集。

III. 山羊胚收集與移置

(i) 動物麻醉

每頭母羊於術前肌肉注射 0.2 mg/kg xylazine (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Germany) 與 0.025 mg/kg 硫酸阿托品 (atropine sulfate, 信東生技股份有限公司, 臺灣)，先行基礎鎮靜 10 min 後，續以靜脈注射 0.75 mg/kg 之舒泰 50® (Zoletil 50, Zolazepam base, 25 mg/mL, Virbac, French) 進行先導麻醉，後以異氟醚 (Isoflurane, Piramal Healthcare, India) 進行氣體麻醉。

(ii) 外科手術胚收集

供胚羊經上述處理後於第 19 天進行腹腔外科手術。首先檢視卵巢外觀 (圖 1)，觀察並記錄卵巢上之排卵點後，以含 1% fetal bovine serum 之 dulbecco's phosphate-buffered saline 沖胚液，由繖部沖洗，於子宮角及子宮體交接處收集，左右兩側沖洗液分別收集於 50 mL 無菌離心試管中靜置沈澱，經以無菌吸管吸取其下層含沉澱物液體，移置解剖顯微鏡下進行胚收集。收集之體內發育山羊胚，再以含 5% FBS 之 M-199 (Media 199, Thermo Fisher Scientific Inc, United States) 至少清洗 3 次後，依據 Putney *et al.* (1988) 所述桑椹期或囊胚期進行胚分級後，進行玻璃化冷凍保存。

IV. 山羊胚玻璃化冷凍及解凍

(i) 玻璃化冷凍

本研究使用兩種玻璃化冷凍配方及策略進行山羊胚之玻璃化冷凍。玻璃化冷凍均使用兩階段平衡冷凍。第一組為 ethylene glycol + DMSO 組：第一階段冷凍配方為 10% EG，10% DMSO，0.5 M trehalose，平衡時間 5 min；第二階段 16.5% EG、16.5% DMSO 及 0.5 M trehalose，平衡時間 45 s。第二組為 EG + PG 組：第一階段 2% EG、2% PG 及 0.4 M trehalose，平衡時間 12 min；第二階段 17.5% EG、17.5% PG 及 0.4 M trehalose，平衡時間 30 s。平衡完後之山羊胚依據胚期進行分組後以每個冷凍板 (Cryotop®, No. 81111, KITAZATO, Japan) 放置 3 個胚的方式直接插入液態氮中進行冷凍。

(ii) 解凍

冷凍山羊胚自液態氮移出後，即依照不同處理組程序進行解凍。解凍方式會隨著冷凍方式而有不同亦分成兩組，EG + DMSO 組：含 0.5 M trehalose 之 20% FBS M-199，溫度 38.5°C，平衡 30 s 後，移入含 0.2 M trehalose 之 20% FBS M-199，溫度 38.5°C，平衡 2 min，再移入含 0.1 M trehalose 之 20% FBS M-199，溫度 38.5°C，平衡 5 min。最後再移入含 5% FBS 之 M-199 胚培養液中，於 38.5°C、5% CO₂ 及 100% 濕度條件之培養箱中進行培養 2 h 進行形態恢復觀察後進行胚移置。另 EG + PG 組：將 0.4 M trehalose 之 20% FBS M-199 解凍液置於 3.5 cm 培養皿 (No. 150326, Thermo Scientific™ Cell Culture Dishes, Massachusetts, United States)，並置於 42°C 加熱板上 (HI1220, Leica, Illinois, United States) 至少 20 min 平衡。胚自液態氮移出後置入 42°C 解凍液解凍 5 s，隨後將胚移至溫度 38°C 之含 0.2 M trehalose 之 20% FBS M-199 培養液，平衡 1 min，續移至溫度 38°C 含 0.1 M trehalose 之 M-199 (含 20% FBS) 培養液平衡 1 min 後，再移入溫度

38℃含 0.05 M trehalose 之 M-199 (含 20% FBS) 培養液平衡 1 min (Tamas *et al.*, 2014)。最終移入含 5% FBS 之 M-199 胚培養液中，於 38.8℃、5% CO₂ 及 100% 濕度條件之培養箱中進行培養 2 h。進行形態恢復觀察後進行胚移置 (圖 2)。



圖 1 供胚羊卵巢黃體。

Fig. 1. The corpus luteum of the donor ovary.

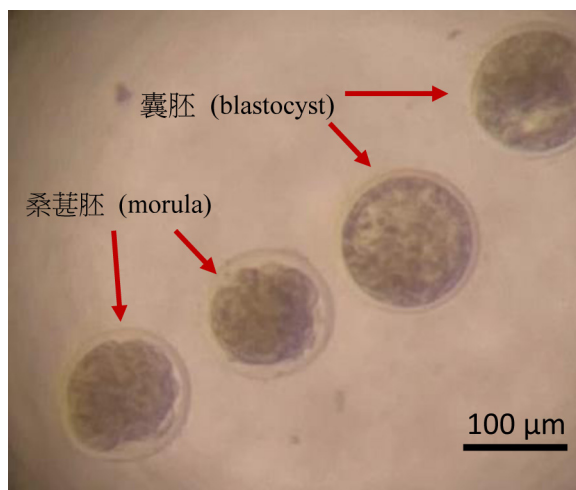


圖 2. EG + PG 處理組山羊胚解凍 2 h 後之形態。

Fig. 2. Morphological restoration of the frozen-thawed embryos 2 h after cultured in the EG + PG treatment group.

V. 懷孕檢測

移胚後 45 及 72 天以超音波掃描儀 (Aloka, SSD-500, Japan) 配合直腸探棒 (Aloka, Transrectal probe, linear type, 3.5 MHz, Japan)，經由子宮腔內宮阜與胎兒影像確診懷孕之母羊。

VI. 資料統計

本試驗各處理組以 SAS(statistical analysis system, SAS, 2012) 套裝軟體中 t-test 進行變異分析 (analysis of variance, ANOVA)，各處理組性能表現平均值間之差異顯著性以 $P < 0.05$ 為具差異顯著性。

結果與討論

本研究以不同之山羊胚玻璃化冷凍保護劑組合及程序，評估其對山羊胚玻璃化冷凍解凍後品質與後續發育之影響。供胚羊以外科腹腔手術進行體內胚收集，收集之山羊胚均分後依不同組別設計進行處理。在 15 次供胚羊腹腔外科手術中，共觀察 99 黃體，收集 71 個山羊胚，包含桑葚胚 18 個 (25.4%)，囊胚 36 個 (50.7%)，未受精、退化或發育停滯胚 17 個 (23.9%) (表 1)。

比較不同冷凍配方 (EG + DMSO, EG + PG) 處理之桑葚胚及囊胚經過冷凍解凍後，於 38.8℃、5% CO₂ 及 100% 濕度條件下進行 2 h 之培養，結果顯示利用 EG + DMSO 組及 EG + PG 組的桑葚胚於解凍後培養 2 h 之形態恢復率分別為 $55.6 \pm 9.6\%$ vs. $63.9 \pm 12.7\%$ ；囊胚之恢復率則為 $66.7 \pm 23.6\%$ vs. $76.0 \pm 2.0\%$ ，EG + PG 組在囊胚解凍後恢復率表現上明顯優於 EG + DMSO 組 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 1. 山羊胚收集時之黃體數、胚回收率及各胚期胚數

Table 1. The number of corpus luteum, the recovery rate and developmental stage of harvested goat embryos

No. of corpus luteum	No. of embryos recovered (%) [*]	No. of embryo development (%)		
		Morula	Blastocyst	Developmental arrest
99	71 (71.7)	18 (25.4)	36 (50.7)	17 (23.9)

^{*} 10 does with 15 times surgical embryo recovery.

表 2. 不同處理組冷凍胚數量及解凍後 2 h 胚形態恢復百分比

Table 2. The effect of different cryopreservation methods on the morphological restoration rate of morula and blastocyst embryos 2 h after post-thawing culture

Treatment group	No. of frozen embryos and stage		No. of retorted embryos and the developmental stage	
	Morula	Blastocyst	Morula (%) ¹	Blastocyst (%) ¹
EG + DMSO	7	15	4 (55.6 ± 9.6%)	10 (66.7 ± 23.6%) ^b
EG + PG	11	21	7 (63.9 ± 12.7%)	16 (76.0 ± 2.0%) ^a

^{a, b} Values without the same superscripts in the same column are significantly different ($P < 0.05$).

¹ No. of morphologically restored embryos 2 h after culture/ no. of frozen-thawed embryos.

Alex and Higgins (2013) 研究指出，EG、DMSO 和 PG 在 21℃ 時的滲透率分別為 6.4、8.4 和 4.0 $\mu\text{m}/\text{min}$ 。一般正常情況下，水分子在 20 – 25℃ 條件下的擴散速率是 0.195 – 1.150 $\mu\text{m}/\text{min}$ ，若是滲透速率過高則會導致細胞膜內外滲透壓差太大而受到損傷。DMSO 已被證明會引起卵母細胞紡錘體聚合，從而增加多倍體形成的可能性 (Kola *et al.*, 1988)，因此常會以 1:1 的方式搭配 EG 或 PG 使用以降低風險 (Gupta *et al.*, 2010)。本研究 EG + PG 組使用了較低的第一階段冷凍保護劑總濃度 (2% EG + 2% PG)，並以較長的時間 (12 min) 予以平衡，使冷凍保護劑能擁有較為充裕的時間置換入細胞內，減緩了細胞膜內外滲透壓差造成的傷害。使胚於冷凍平衡時不須在短時間內 (3 – 5 min) 再受到第二階段高濃度冷凍保護劑衝擊，藉以降低傷害。此做法相較於一般常見與羊胚冷凍時第一階段冷凍保護劑總濃度為 20% (林等, 2018; Vajta *et al.*, 1998) 者不同，解凍後培養 2 h 的恢復率亦較林等 (2018) 為佳 (76.0% vs. 47.7 – 66.6%)。在評估胚存活率，最直接的方法便是進行胚移置，然而移置前藉由胚解凍後恢復形態之時間與其後續發育至孵化囊胚之能力，或可為初步的評估指標 (Kim, 2003; Kim, 2004)。

在解凍溫度上，本試驗中 EG + PG 處理組之冷凍胚解凍溫度為 42℃ 停留 5 s，使用之溫度異於一般 37 – 38.5℃ (林等, 2018)。希望藉由較高的解凍溫度減少胚承受解凍傷害的時間，減少損害影響。在解凍晚期胚，如桑葚胚及囊胚階段，冷凍損傷的評估變得非常複雜，一般可接受的胚存活率及胚移置標準為冷凍處理後，解凍後至少有 50% 胚存活。然而即便是符合胚移置標準，多數胚解凍後經過後續體外培養，在細胞數上均不及體內胚，這表示解凍後之囊胚雖然還活著，但是發育能力已經受損，導致胚移置的成功率相對降低 (Guerif *et al.*, 2002)。

在探討不同胚期的胚對冷凍解凍及胚移置的影響試驗中，以 EG + PG 組處理之桑葚胚及囊胚進行解凍後之胚移置，結果顯示移置後 45 天以超音波進行懷孕檢測之懷孕率分別為 66.7 ± 28.8% vs. 66.7 ± 57.7%；而在胚移置效率上桑葚胚及囊胚為 60.0 ± 15.0% vs. 55.6 ± 19.2%，桑葚胚及囊胚移置後之懷孕率及移置胚發育率均無顯著差異 (表 3)。於體外受精及培養的胚發現，在原核期進行冷凍解凍後的胚，存活率較囊胚期進行冷凍者佳，此一現象在豬 (Gupta *et al.*, 2010)，牛 (Lim *et al.*, 1991) 及人 (Al-Hasani *et al.*, 2007) 之研究上均有相似之結果。Fonseca *et al.* (2018) 以冷凍解凍後之桑葚胚與囊胚進行移置後之移置效率為 38.5% 及 62.5%，結果較本試驗的桑葚胚移置效率 (55.6%) 稍差外，囊胚 (60.0%) 移置效率則相似。

表 3. 以 EG + PG 組處理方法進行不同期別之山羊冷凍胚解凍後經移置之懷孕率與胚發育率

Table 3. The pregnancy rate and embryo development rate of different stages frozen-thawed goat embryos after embryo transfer with EG + PG group treatment

Embryo stage	No. of recip-ients	No. of embryos transferred	Pregnancy rate (n) ¹	Kidding rate (n) ²
Morula	5	15	66.7 ± 28.8 (3)	60.0 ± 15.0 (9)
Blastocyst	3	9	66.7 ± 57.7 (2)	55.6 ± 19.2 (5)

¹ No. of recipient pregnancies / no. of recipients (based on ultrasonographic detection on day 45 after embryo transfer).

² No. of offspring / no. of embryos transferred.

綜合上述結果，以 EG + PG 組處理方式進行之山羊胚玻璃化冷凍，在囊胚解凍後經體外培養 2 h 之形態恢復程度上較 EG + DMSO 組稍佳。因此使用本研究中冷凍保護劑 EG + PG 組合、以及冷凍解凍程序可替代使用 DMSO 為抗凍劑之諸多不良影響，提升解凍後囊胚形態恢復之效率。

參考文獻

- 林信宏，黃政齊，康定傑，王得吉，郭廷雍，康獻仁，劉世賢，劉炳燦，彭劭于，沈朋志。2018。冷凍方式對源自體內發育山羊囊胚解凍後發育能力之影響。畜產研究 51(2)：126-133。
- Alex, M. V and A. Z. Higgins. 2013. Membrane permeability of the human granulocyte to water, dimethyl sulfoxide, glycerol, propylene glycol and ethylene glycol. *Cryobiology* 68: 35-42.
- Al-Hasani, S., B. Ozmen, N. Koutlaki, B. Schoepper, K. Diedrich, and A. Schultze-Mosgau. 2007. Three years of routine vitrification of human zygotes: is it still fair to advocate slow-rate freezing? *Reprod. Biomed. Online* 14: 288-293.
- Fonseca, J. F., R. I. T. P. Batista, J. M. G. Souza-Fabjan, M. E. F. Oliveira, F. Z. Brandão, and J. H. M. Viana. 2018. Freezing goat embryos at different developmental stages and quality using ethylene glycol and a slow cooling rate. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70: 1489-1496.
- Guerif, F., R. Bidault, V. Cadoret, M. L. Couet, J. Lansac, and D. Royere. 2002. Parameters guiding selection of best embryos for transfer after cryopreservation: a reappraisal. *Hum Reprod.* 17: 1321-1326.
- Gupta, M. K., S. J. Uhm, and H. T. Lee. 2010. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and *in vitro* development of oocytes vitrified before or after *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 93: 2602-2607.
- Hartshorne, G. M., K. Elder, and R. G. Edwards. 1991. The influence of in-vitro development upon post-thaw survival and implantation of cryopreserved human blastocysts. *Hum. Reprod.* 6: 136- 141.
- Kasai, M. 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 42: 67-75.
- Kasai, M. 2002. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reprod. Med. Biol.* 1: 1-9.
- Kim, E. Y. 2003. Effect of vitrification method on the *in vitro*/*in vivo* development of bovine follicular oocytes [dissertation]. Konkuk Univ. Seoul. Korea.
- Kim, Y. M. 2004. Development of a new vitrification container of bovine embryo freezing [dissertation]. Konkuk Univ. Seoul. Korea.
- Kola, I., C. Kirby, J. Shaw, A. Davey, and A. Trounson. 1988. Vitrification of mouse oocytes results in aneuploid zygotes and malformed fetuses. *Teratology* 38: 467-474.
- Lassalle, B., J. Testart, and J. P. Renard. 1985. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1, 2 propanediol. *Fertil. Steril.* 44: 645-651.
- Lim, J. M., Y. Fukui, and H. Ono. 1991. The post-thaw developmental capacity of frozen bovine oocytes following *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology* 35: 1225-1235.
- Menezes, Y., B. Nicollet, and D. Andr. 1992. Freezing cocultured human blastocysts. *Fertil. Steril.* 58: 977-980.
- Putney, D. J. M. Dorst, and W. W. Thatcher. 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology* 30: 195-209
- Rall, W. F. and G. M. Fahy. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature* 313: 573-575.
- SAS, 2012. SAS User's Guide: Statistics, SAS Inst., Inc., Cary, NC. USA.
- Schiewe, M. C., M. Bush, L. S. Stuart, and D. E. Wildt. 1984. Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: A preliminary study. *Theriogenology* 22: 675-682.
- Tamas, S., K. Yoshioka, F. Tanihara, H. Kaneko, J. Noguchi, N. Kashiwazaki, T. Nagai, and K. Kikuchi. 2014. Generation of live piglets from cryopreserved oocytes for the first time using a defined system for *in vitro*. *PLoS One* 9: e97731.
- Vajta, G., P. Holm, M. Kuwayama, P. J. Booth, H. Jacobsen, T. Greve, and H. Callesen. 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53-58

Effects of cryoprotectants frozen-thawed procedures on the development of vitrified goat embryos ⁽¹⁾

Ting-Chieh Kang ⁽²⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾ Kai-Fei Tseng ⁽⁴⁾ Qu-You Huang ⁽²⁾ Yu-Hsin Chen ⁽²⁾
Fung-Hsiang Chu ⁽³⁾ Hsin-Hung Lin ⁽³⁾ Hsiang-Yuan Hsing ⁽⁵⁾ and Perng-Chih Shen ⁽⁶⁾⁽⁷⁾

Received: Jun. 13, 2022; Accepted: Mar. 25, 2023

Abstract

The aim of this study was to compare the effects of two vitrified cryoprotective methods on the developmental competence of goat embryos after freezing and thawing. In the first experiment, the collected embryos were divided into two groups, ethylene glycol (EG)+ dimethyl sulfoxide (DMSO) group (7 morulas, 15 blastocysts). The first stage frozen formula was 10% EG, 10% DMSO, 0.5 M trehalose and the equilibration time was 5 min. For the second stage 16.5% EG, 16.5% DMSO and 0.5 M trehalose, the equilibration time was 45 sec. EG + PG group (11 morulas, 21 blastocysts): the first stage was 2% EG, 2% PG and 0.4 M trehalose. The equilibration time was 15 min; the second stage was 17.5% EG, 17.5% PG and 0.4 M trehalose. The equilibration time was 30 sec. A total of 99 corpus luteum were observed and 71 embryos were recovered (18 morulas, 36 blastocysts, and 17 aborted embryos). The experimental results showed that regardless of the EG + DMSO group or the EG + PG group, there was no significant difference in the morphological recovery rate after culturing in the incubator under the conditions of 38.8°C, 5% CO₂ and 100% humidity for 2 h (morula: 55.6 ± 9.6% vs. 63.9 ± 12.7%, blastocyst: 66.7 ± 23.6% vs. 76.0 ± 2.0%). In addition, the morulas and blastocysts treated with the EG + PG were subsequently subjected to embryo transfer. Again, there were also no significant differences in the pregnancy rate and embryo transfer efficiency of morulas and blastocysts (66.7 ± 28.8% vs. 66.7 ± 57.7%, 60.0 ± 15.0% vs. 55.6 ± 19.2%). The comprehensive experimental results showed that the efficiency of the combination of EG and PG was similar to the recovery efficiency after thawing with the EG and DMSO. There was no significant difference in the pregnant rate and embryo transfer efficiency of the morula and blastocyst treated with the EG and PG after transfer. The treatment method and strategy of EG + PG can replace the use of highly toxic DMSO, and can be used for freezing and embryo transfer of morula and blastocyst.

Key words: Embryo transfer, Embryo vitrification, Goat.

(1) Contribution No. 2741 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

(2) Hengchun Branch, COA-LRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

(3) Physiology Division, COA-LRI, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(4) Kaohsiung Animal Propagation Station, COA-LRI, Pingtung 91247, Taiwan, R. O. C.

(5) Institute of Biomedical Science, National Chung Hsing University, Taichung, 40227, Taiwan, R. O. C.

(6) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, 91201, Taiwan, R. O. C.

(7) Corresponding author, E-mail: pcshen@mail.npust.edu.tw..