

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⁽¹⁾

楊鎮榮⁽²⁾ 黃政齊⁽²⁾ 謝明江⁽²⁾

收件日期：88 年 1 月 19 日；接受日期：88 年 2 月 22 日

摘 要

本試驗之目的在探討各種可能對山羊精液冷凍再解凍後精子存活率及活力之影響因子，以期發展出適合山羊精液冷凍保存條件，作為未來生產推廣乳羊冷凍精液及人工授精之用。

山羊精液以假陰道採取後，立即以精子分析儀（Hamilton-Thorn HTM-C 型）進行精子濃度、存活率、活力等精液性狀之評估，並經適當稀釋至最終濃度為每支麥管含 1.5×10^8 個精子，在精液稀釋冷凍過程中比較下列不同處理，以了解其對解凍後精液性狀之影響：（1）稀釋前先行離心去除精漿與否（2）第一段稀釋液為含 10% 脫脂乳粉或 20% 蛋黃-枸橼酸鈉之稀釋液（3）第二段稀釋液含 3.5% 或 7.0% 甘油之冷凍保護劑（4）以 0.25 ml 或 0.5 ml 之麥管填充後冷凍（5）以二步驟降溫法或單步驟降溫法進行冷凍。試驗結果顯示，（A）使用脫脂乳粉為第一段稀釋液者，解凍後之精液性狀極顯著優於以蛋黃-枸橼酸鈉稀釋者（ $P < 0.01$ ）（存活率分別為 $57.5 \pm 11.9\%$ vs. $17.5 \pm 10.1\%$ ；活力則分別為 2.9 ± 0.5 vs. 1.3 ± 0.5 ）。（B）採精後是否先行離心去除精漿對於以脫脂乳粉處理者之解凍後精液性狀之影響不顯著。（C）比較 3.5% 或 7.0% 甘油為冷凍保護劑，不論精漿存在與否，其對於解凍後之存活率並無顯著之影響；然在活力方面，未離心去除精漿並以 7.0% 甘油者，解凍後之活力顯著優於以 3.5% 甘油者（ $P < 0.05$ ）（活力分別為 3.1 ± 0.5 vs. 2.4 ± 0.3 ）。

（D）以二步驟降溫法進行冷凍降溫，解凍後之精液性狀極顯著優於單步驟法者（ $P < 0.01$ ）（存活率與活力分別為 $58.5 \pm 12.1\%$ vs. $22.9 \pm 11.9\%$ ； 3.0 ± 0.5 vs. 1.6 ± 0.4 ）。（E）以 0.25 ml 或 0.5 ml 麥管填充並配合二步驟降溫法進行冷凍者，解凍後之精液性狀並無顯著之差異。冷凍精液之受精能力以人工授精方式評估，獲得兩母山羊群之受胎率分別為 36.8% 與 30.6%，顯示以此方法保存之冷凍精液在解凍之後仍具有受精能力。

本試驗結果顯示使用 10% 脫脂乳粉為稀釋液，山羊新鮮精液不必離心去除精漿，其結果並不影響解凍後精液性狀，且在稀釋液中含 7.0% 甘油作為冷凍保護劑，及採用 0.25 ml 或 0.5 ml 麥管填充，並以二步驟降溫法進行冷凍者，可得到最佳之冷凍效果，且解凍後仍具有良好之受精能力，此可做為未來山羊精液冷凍保存及應用推廣之參考。

關鍵詞：山羊、精液、稀釋、冷凍。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 939 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所恒春分所。

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。山羊精液稀釋液之種類繁多，實用上仍以脫脂乳粉及蛋黃枸橼酸鹽兩種稀釋液較為普遍 (Chemineau *et al.*, 1991)，然而山羊精漿中存在有分泌自尿道球腺之酵素，會分解脫脂乳粉或蛋黃成分而影響精液之性狀，因此精漿去除與否攸關冷凍精液之品質甚鉅 (Evans and Maxwell, 1987; Pellicer, 1995)。Ritar and Salamon (1982) 認為山羊精液在稀釋前先去除精漿可獲得較佳之精子活力，尤其以添加蛋黃之稀釋液為然；但 Chauhan and Anand (1990) 指出蛋黃加入未去除精漿之山羊精液中並不影響精子之活力。精子在冷凍過程中所使用之冷凍保護劑種類及濃度，亦為影響精液品質之關鍵，常用的冷凍保護劑有甘油 (glycerol)、乙二醇 (ethylene glycol) 與丙二醇 (propylene glycol) 等，Waide *et al.* (1977) 指出使用乙二醇或丙二醇對山羊精子的冷凍保護效果比甘油差，且最佳的甘油濃度在 4~7%。此外，使用 0.25 ml 或 0.5 ml 麥管裝填，以及冷凍過程中的降溫速率，也是影響冷凍精液品質的關鍵。因此，為生產高品質之山羊冷凍精液，以有效推廣山羊人工授精技術，本試驗即對山羊冷凍精液生產過程中之影響因子，如精漿去除與否、稀釋液種類、甘油濃度、麥管容積與冷凍速率等進行探討，期藉此尋求山羊冷凍精液保存的最佳條件。

材料與方法

I. 採精與調查項目：

性成熟之阿爾拜因與撒能公羊利用假陰道進行採精，採出之精液以精子分析儀進行精子濃度、存活率、活力等精液性狀之評估，並經適當稀釋至最終濃度為每支麥管含 1.5×10^8 個精子後，在精液稀釋冷凍過程中比較下列不同處理，以評估其對冷凍精液解凍後精液性狀之影響：

(i) 精液稀釋前是否先行離心去除精漿：

去除精漿組係以速保精 (Sperm-up, 中國化學製藥 Q43) 洗滌二次，第一次先加入總精液量 10 倍體積之 37°C 速保精，以 $600 \times g$ 離心 15 分鐘，去除懸浮液後，再依上述同樣處理方法再離心洗滌一次。

(ii) 稀釋液之種類：

在第一階段稀釋中，比較含 10% 脫脂乳粉 (skim milk powder) 或 20% 蛋黃－枸橼酸鈉 (egg yolk-sodium citrate) 兩種不同稀釋液之效果。添加第一段稀釋液後須平衡 90 分鐘，並使溫度緩慢降至 4°C。

(iii) 甘油濃度：

在第二階段稀釋中，以含有 7.0% 或 14.0% 甘油 (Sigma G-7757) 為冷凍保護劑，並與第一階段稀釋之精液對半稀釋後，使甘油之最終濃度為 3.5% 或 7.0%。甘油分三次加入，每次間隔 10 分鐘，添加甘油後須於 4°C 再平衡 90 分鐘。

第一與第二階段稀釋液之配方如表 1 所示。

(iv) 麥管容量：

比較以 0.25 ml 或 0.5 ml (IMV, France) 兩種不同容量麥管之裝填效果。

表 1. 第一及第二階段山羊精液稀釋液之成分

Table 1. Composition of diluents for the first and second steps of dilution for goat semen

Ingredients	1st diluent		2nd diluent	
	Skim milk	Egg yolk-citrate	7%Glycerol	14%Glycerol
Glucose (anhydrous) (g)	0.194	0.194	0.194	0.194
Skim milk powder (g)	10	—	10*	10*
Egg yolk (ml)	—	20	20**	20**
Sodium citrate (g)	—	3.52	3.52**	3.52**
Streptomycin (μg /ml)	2.5	2.5	—	—
Penicillin (IU)	2500	2500	—	—
Glycerol (ml)	—	—	7	14
Total volume (ml)	100	100	100	100

* The 1st diluent is skim milk only.

** The 1st diluent is egg yolk-citrate only.

(v) 冷凍速率：

比較二步驟降溫法，即先於 -80°C 2分鐘，再於 -110°C 3分鐘，然後置入液態氮；或單步驟降溫法，即直接於 -80°C 10分鐘，然後置入液態氮。

由於精子於體外之存活率與活力受環境溫度變化影響極大，因此整個冷凍精液的操作過程中溫度的掌控極為重要，圖 1 所示即為冷凍精液操作流程中各階段的溫度控制圖。

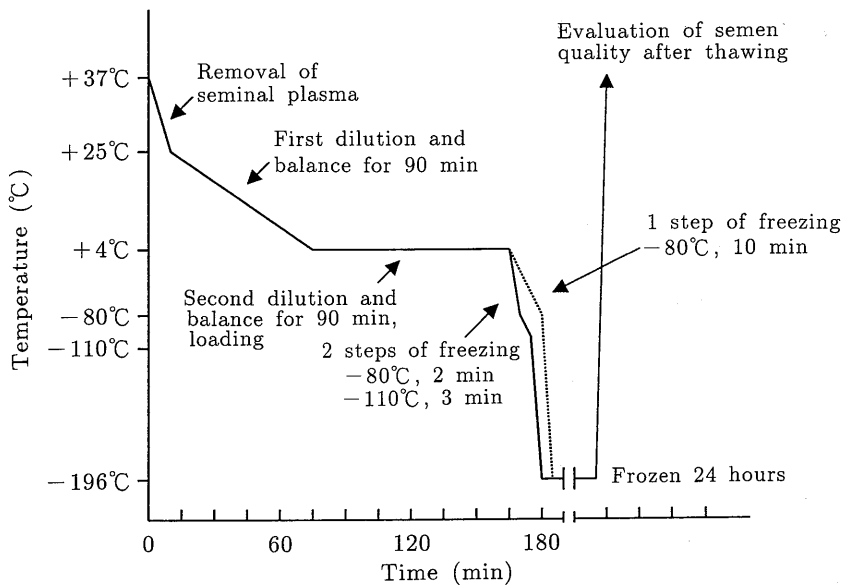


圖 1. 山羊精液冷凍降溫流程圖。

Fig. 1. The freezing scheme of goat semen.

II. 冷凍精液性狀評估指標：

精液性狀之評估係以精子分析儀依黃與楊（1997）進行，每個精液樣品逢機採樣 3 次，並於精子分析儀下逢機判讀 3~5 個視野，並將結果平均以得客觀的判讀結果。以精子分析儀進行評估之項目與指標如下：

(i) 精液濃度：

新鮮精液以人工假陰道採出後即以速保精 200 倍稀釋，並以精子分析儀計算濃度。

(ii) 存活率：

以精子分析儀直接鏡檢精子之存活率，經精子分析儀判讀後如於精子頭帽處標以紅點者，表示該精子為活精子；若為藍點者表示為死精子；若為綠點者表示為無法判讀之精子，由此計算出總活精子數之比例。

(iii) 活力：

於 37°C 之恆溫狀態下，以精子分析儀判讀精子之活力，精子分析儀會對每個精子之活力給予：

(A) 4=rapid (B) 3=medium (C) 2=slow (D) 0~1=static，並計算出不同活力之精子數所佔總精子數之比例，再依經過校正後公式做如下修正，以符合傳統 0~5 分之評分標準：

$$\text{Score I} = (A\% \times 5) + (B\% \times 4) + (C\% \times 3) + (D\% \times 1) \quad (\text{當存活率} \geq 20\%)$$

$$\text{Score II} = (A\% \times 5) + (B\% \times 4) + (C\% \times 3) + (D\% \times 0.5) \quad (\text{當存活率} < 20\%)$$

III. 冷凍精液受精能力試驗：

冷凍精液解凍後之受精能力評估，係對經發情同期化處理之阿爾拜因與撒能兩母羊群，以人工授精方式進行評估。母羊群先以陰道內助孕素釋放器（CIDR[®], AHI Inc., New Zealand）埋植 11 天，惟於第 9 天時注射 125 µg 之合成前列腺素（cloprostenol, Estrumate[®], Coopers, Germany），母羊於注射前列腺素約 48 小時後開始發情，發情後約 8~12 小時即進行人工授精。進行人工授精前，冷凍精液先於 37°C 恆溫水浴中維持 30 秒後，將麥管填充於傳統之人工授精槍，以穿越子宮頸方式將精液注入子宮角前端，即完成人工授精程序。人工授精後第 45 天依楊與黃（1996）所建立之母羊超音波懷孕診斷技術，以超音波掃描儀（Aloka 500 型）配合直腸穿透型探頭（Transrectal transducer, linear type, 3.5 MHz）進行孕診，以得知母羊群之受胎率。

IV. 統計分析：

試驗所得之資料係依統計分析系統（Statistics Analysis System, SAS, 1988）進行統計分析，所得資料以平均值±標準偏差（Mean±SD）表示之，並使用一般線性模式程序（General Linear Model Procedure）進行變方分析，以鄧肯氏多變域測定法（Duncan's Multiple Range Test），比較各處理間差異之顯著性。

結果與討論

公羊精液採出後立即以含 10%脫脂乳粉或 20%蛋黃—枸橼酸鈉之稀釋液進行稀釋，並於稀釋前比較是否先行離心去除精漿對於山羊精液冷凍再解凍後之存活率與活力之影響，其結果如圖 2、3 所示。以脫脂乳粉為稀釋液者，稀釋前是否先行離心去除精漿，對於解凍後所得之精子存活率及活力並無顯著影響（ $P > 0.05$ ），未離心去除精漿與去除精漿者之存活率與活力分別為 $58.8 \pm 13.9\%$ vs. $54.1 \pm 14.0\%$ ； 3.2 ± 0.5 vs. 3.0 ± 0.5 。比較以脫脂乳粉或蛋黃-枸橼酸鈉為稀釋液者，不論精漿存在或去除，以脫脂乳粉者解凍後之精液性狀極顯著優於蛋黃-枸橼酸鈉組者（ $P < 0.01$ ），脫

脂乳粉與蛋黃－枸橼酸鈉稀釋液之存活率與活力分別為 $57.5 \pm 11.9\%$ vs. $17.5 \pm 10.1\%$; 2.9 ± 0.5 vs. 1.3 ± 0.5 。

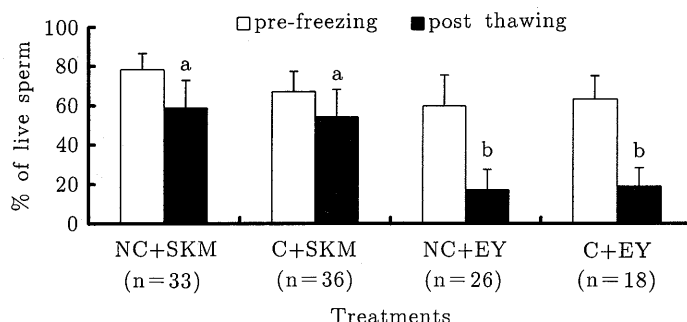


圖 2. 精漿存在與否（存在，NC；去除，C）及稀釋液種類（脫脂乳粉，SKM；蛋黃－枸橼酸鈉，EY）對精子冷凍前與解凍後存活率之影響。處理組間標示不同英文字母者表示差異顯著（ $P < 0.01$ ）。

Fig. 2. Effects of diluents containing skim milk (SKM) or egg yolk-sodium citrate (EY), and with (non-centrifugation, NC) or without (centrifugation, C) seminal plasma during the diluting process on the percentage of live sperm in pre-freezing and post thawing of semen. Bars with different letters between treatments are different significantly ($P < 0.01$).

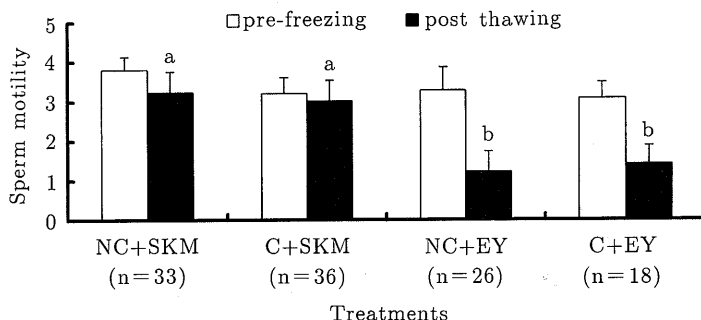


圖 3. 精漿存在與否（存在，NC；去除，C）及稀釋液種類（脫脂乳粉，SKM；蛋黃－枸橼酸鈉，EY）對精子冷凍前與解凍後活力之影響。處理組間標示不同英文字母者表示差異顯著（ $P < 0.01$ ）。

Fig. 3. Effects of diluents containing skim milk (SKM) or egg yolk-sodium citrate (EY), and with (non-centrifugation, NC) or without (centrifugation, C) seminal plasma during the diluting process on the motility of sperm in pre-freezing and post thawing of semen. Bars with different letters between treatments are different significantly ($P < 0.01$).

一般常用於精液冷凍保存之稀釋液為脫脂乳粉或蛋黃稀釋液（Salamon and Maxwell, 1995），因為存在於脫脂乳粉之乳蛋白與蛋黃中之脂蛋白與磷脂質，在低溫環境中具有安定精子細胞膜之作用（De Leeuw *et al.*, 1991）；然而，無論是使用脫脂乳粉或蛋黃稀釋液，精漿存在與否一直是影響精子存活與活力之關鍵因素。因為公羊精漿中存在有分泌自尿道球腺之蛋黃凝集因子－磷酸解

酯酵素 A (phospholipase A) (Roy, 1957; Evans and Maxwell, 1987)，此酵素會分解蛋黃中之卵磷脂(lecithin)，產生游離脂肪酸與有害於精子存活之溶血卵磷脂(lysolecithin)(Nunes, 1982)，因此 Fukuhara and Nishikawa (1973) 認為加入蛋黃稀釋液前，先行去除精漿可獲得較佳的精子存活率，Ritar and Salamon (1982) 亦認為使用蛋黃稀釋液，在稀釋前先行離心去除精漿處理，冷凍解凍後可得到較佳之精子活力，且清洗二次之效果又優於一次者。然而，Chauhan and Anand (1990) 指出以蛋黃稀釋液加入未去除精漿之山羊精液，其結果並不影響精子之存活。因此，蛋黃與精漿間之作用對於精子存活與活力之影響並未有一致之結果。使用脫脂乳粉為稀釋液者雖無如上述蛋黃分解之作用，然而 Nunes *et al.* (1982) 以牛乳稀釋液保存山羊精液時發現，非繁殖季節之精漿對於精子之存活有負面之作用，顯示精漿中仍存在有影響精子於體外存活之因子。而 Pellicer (1995) 更進一步指出尿道球腺之分泌物中存在著會分解牛乳成分之酵素，此作用抑制精子之活力，其將此酵素分離純化並命名為 triacylglycerol lipase。

雖然，稀釋液與精漿間之分解作用會影響精子存活與活力，然而離心處理過程亦是影響精子性狀良窳之關鍵。Gonzales-Stagnaro (1975) 即指出離心會對精子造成傷害，因此認為不去除精漿對於精子活力有較佳之效果。以本試驗脫脂乳粉處理者之結果顯示，經離心處理後之精子，無論是冷凍前或是解凍後之存活率與活力均略低於未離心者，之間雖無顯著差異，但仍顯示離心處理對精子性狀有不良影響。雖然離心洗滌兩次能將精漿較完全去除，可以摒除精漿與稀釋液間之分解作用，然而離心所造成的傷害仍應重視之。因此，無論使用蛋黃或脫脂乳粉為稀釋液，精漿存在與否及離心操作，均是影響冷凍精液品質之重要因素。

若以上述所得較佳結果之 10% 脫脂乳粉為稀釋液者，比較是否離心去除精漿處理與以 3.5% 及 7.0% 甘油為第二階段冷凍保護劑者對冷凍精液解凍後性狀之影響，結果以 3.5% 或 7.0% 甘油為冷凍保護劑，不論精漿存在與否，其對於解凍後之存活率並無顯著之影響 ($P > 0.05$)，3.5% 甘油者與 7.0% 甘油者之存活率分別為 $52.3 \pm 12.4\%$ vs. $56.3 \pm 11.5\%$ (如圖 4)；然在活力方面，未離心去除精漿並以 7.0% 甘油者，解凍後之活力顯著優於以 3.5% 甘油者及先行離心去除精漿者 ($P < 0.05$)，活力分別為 3.1 ± 0.5 vs. 2.4 ± 0.3 , 2.6 ± 0.4 (如圖 5)。

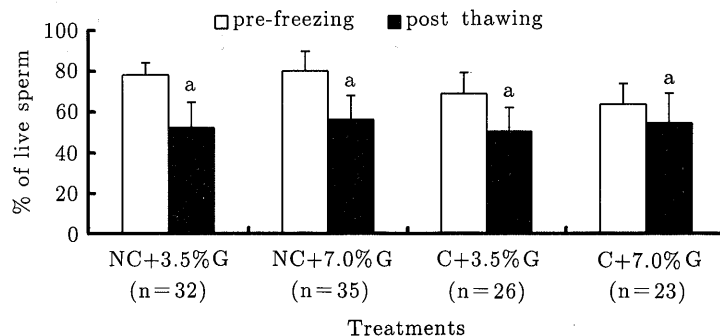


圖 4. 精漿存在與否 (存在, NC; 去除, C) 及脫脂乳粉稀釋液中甘油濃度 (3.5% G; 7.0% G) 對精子冷凍前與解凍後存活率之影響。處理組間標示相同英文字母者表示未呈差異 ($P > 0.05$)。

Fig. 4. Effects of seminal plasma (removal with centrifugation, C; or existence without centrifugation, NC) and concentration of glycerol (3.5% G; 7.0% G) in diluents on the percentage of live sperm in pre-freezing and post thawing of semen. Bar with the same letters between treatments are not different significantly ($P > 0.05$).

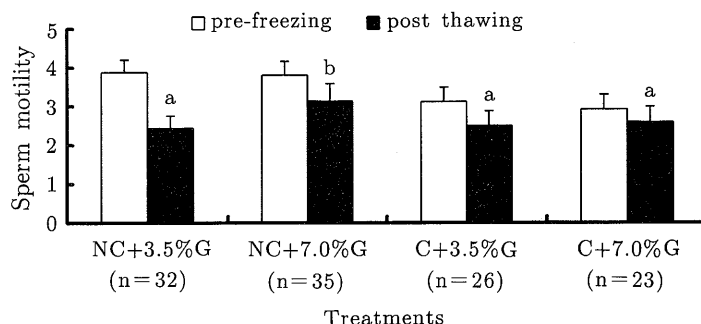


圖 5. 精漿存在與否（存在，NC；去除，C）及脫脂乳粉稀釋液中甘油濃度（3.5% G；7.0% G）對精子冷凍前與解凍後活力之影響。處理組間標示不同英文字母者表示差異顯著（ $P < 0.05$ ）。

Fig. 5. Effects of seminal plasma (removal with centrifugation, C; or existence without centrifugation, NC) and concentration of glycerol (3.5% G; 7.0% G) in diluents on the motility of sperm in pre-freezing and post thawing of semen. Bars with different letters between treatments are different significantly ($P < 0.05$).

若依上述試驗結果，山羊精液於採精後不先行離心去除精漿，並分別以脫脂乳粉及含 7.0% 甘油之脫脂乳粉為第一及第二段稀釋液，為山羊精液冷凍前之最佳處理組合。因此，以此方式為冷凍前處理，比較冷凍過程中以 0.25 ml 或 0.5 ml 之麥管填充，及以二步驟降溫法及單步驟降溫法對冷凍精液解凍後存活率與活力之影響，所得之結果圖 6、7 所示。以二步驟降溫法進行冷凍降溫者，解凍後之精液性狀極顯著優於以單步驟降溫者（ $P < 0.01$ ），二步驟與單步驟降溫法解凍後之存活率與活力分別為 $58.5 \pm 12.1\%$ vs. $22.9 \pm 11.9\%$ 與 3.0 ± 0.5 vs. 1.6 ± 0.4 。然而以二步驟進行降溫時，使用 0.25 ml 或 0.5 ml 麥管填充者對於解凍後之精液性狀差異不顯著（ $P > 0.05$ ），0.25 ml 與 0.5 ml 麥管解凍後之存活率與活力分別為 $50.5 \pm 12.4\%$ vs. $55.7 \pm 10.1\%$ 與 2.9 ± 0.3 vs. 3.0 ± 0.4 。

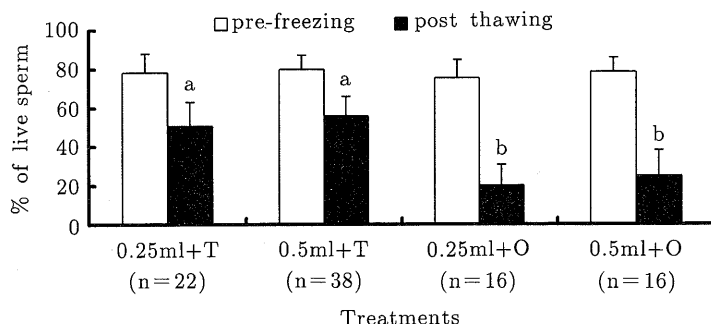


圖 6. 未離心去除精漿及使用 10% 脫脂乳粉與 7.0% 甘油稀釋液，比較麥管容積（0.25 ml；0.5 ml）與冷凍速率（單步驟，O；二步驟，T）對精子冷凍前與解凍後存活率之影響。處理組間標示不同英文字母者表示差異顯著（ $P < 0.01$ ）。

Fig. 6. Effects of straw sizes (0.25 ml or 0.5 ml) and steps of freezing (one step, O; or two steps, T) on the percentage of live sperm in pre-freezing and post thawing of semen. Bars with different letters between treatments are different significantly ($P < 0.01$).

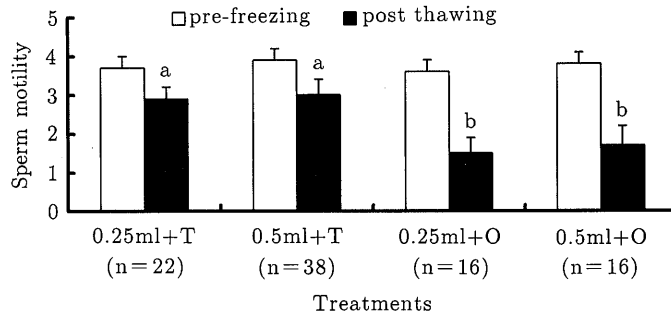


圖 7. 未離心去除精漿及使用 10%脫脂乳粉與 7.0%甘油稀釋液，比較麥管容積 (0.25 ml ; 0.5 ml) 與冷凍速率 (單步驟, O ; 二步驟, T) 對精子冷凍前與解凍後活力之影響。處理組間標示不同英文字母者表示差異顯著 ($P < 0.01$)。

Fig. 7. Effects of straw sizes (0.25 ml or 0.5 ml) and steps of freezing (one step, O ; or two steps, T) on the motility of sperm in pre-freezing and post thawing of semen. Bars with different letters between treatments are different significantly ($P < 0.01$).

Mortimer *et al.* (1976) 曾以蛋黃-枸橼酸鈉為稀釋液，並填充於 0.25 ml 麥管之牛精液為試驗，比較 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11%之甘油濃度，及以 1, 2, 3.5, 7, 12, 20 分鐘從 5°C 降至 -130°C 之冷凍速率，結果以 7%之甘油濃度所得之解凍效果最佳，且與冷凍速率無關，然其解凍後之存活率僅 26%，此試驗雖無脫脂乳粉之處理組，但結果與本試驗以蛋黃枸橼酸鈉為稀釋液者解凍後存活率與活力分別為 $18.1 \pm 9.8\%$ 與 1.3 ± 0.5 之結果極為相近，然此結果卻顯著低於本試驗以脫脂乳粉者。而本試驗中以二步驟降溫法之進行冷凍降溫者，其結果顯著優於以單步驟降溫者，且使用 0.25 ml 或 0.5 ml 麥管填充者對於解凍後之精液性狀差異不顯著。

此外，評估冷凍精液解凍後之受精能力，係以上述試驗所得之最佳冷凍條件，即採精後未離心去除精漿、以 10%脫脂乳粉、7.0%甘油為稀釋液與冷凍保護劑，及以 0.5 ml 麥管填充與二步驟降溫法製成之冷凍精液進行測試。試驗係對經發情同期化處理之母羊群，以直接穿越子宮頸方法進行人工授精，其結果如表 2 所示。以人工授精方式進行受精試驗所得之阿爾拜因與撒能兩個品種母羊群之受胎率分別為 36.8%與 30.6%，顯示以此條件所保存之冷凍精液在解凍之後仍具有受精能力。

表 2. 山羊冷凍精液經解凍後之受精能力試驗

Table 2. The fertilized trial of frozen-thawed goat semen

Semen samples	No. of does evaluated	Conception rate (%)
Alpine-1	38	36.8
Saanen-1	36	30.6

本試驗之結果顯示使用 10%脫脂乳粉為稀釋液，山羊新鮮精液可不先行離心去除精漿，其結果並不影響解凍後精液性狀，且在稀釋液中含 7.0%甘油作為冷凍保護劑，及採用 0.25 ml 或 0.5 ml 麥管填充並以二步驟降溫法進行冷凍者，解凍後可得到較佳之冷凍效果，且以人工授精之方式評估其受精能力，均可得到良好之受胎率，顯示依上述條件製成之山羊冷凍精液具有良好之品質，可做為未來山羊精液冷凍保存及應用推廣之用。

誌 謝

試驗執行期間，承方瑞豐先生協助公羊採精與精液冷凍，謹此致謝。

參考文獻

- 黃政齊、楊鎮榮。1997。精子分析儀在山羊精液品質評估之應用。中畜會誌 26 (增刊) : 149。
- 楊鎮榮、黃政齊。1996。母羊超音波懷孕診斷技術之建立。中畜會誌 25 (增刊) : 200。
- Chauhan, M. S. and S. R. Anand. 1990. Effect of egg yolk lipids on the freezing of goat semen. Theriogenology 34 : 1003~1013.
- Chemineau, P., Y. Cognie, Y. Guerin, P. Orgeur and J. C. Vallet. 1991. Training manual on artificial insemination in sheep and goats. 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.)
- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. ed. Butterworths, Canberra. Australia. pp. 194.
- Fukuhara, R. and Y. Nishikawa. 1973. Effects of pH, sperm concentration, washing and substrate concentration on respiration and motility on goat spermatozoa. Jpn. J. Zootech. Sci. 44 : 266~274.
- Gonzales-Stagnaro, C. 1975. Insemination artificial en cabras con semen congelado. Zootecnia 24 (3-4) : 151~163.
- Mortimer, R. G., W. E. Berndtson, B. D. Ennen and B. W. Pickett. 1976. Influence of glycerol concentration and freezing rate on post-thaw motility of bovine spermatozoa in continental straws. J. Dairy Sci. 59 (12) : 2134~2137.
- Nunes, J. F. 1982. Etude des effets du plasma seminal sur la survie "*in vitro*" des espermatozoides de bouc. Paris. Universidade Pierre et Marie Curie, Paris. Ph. D. thesis.
- Nunes, J. F., J. M. Corteel, Y. Combarrous and G. Baril. 1982. Role of seminal plasma in the *in vitro* survival of goat sperm. Reprod. Nut. Dev. 24 (4) : 611~620.
- Pellicer, M. T. 1995. Purificacion Y caracterizacion del componente de la secrecion bulbouretral de macho cabrio implicado en el deterioro de la calidad de los espermatozoides diluidos en leche. Tesina de Licenciatura. Universidad de Murcia, p. 200.
- 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 (3) : 305~312.
- Roy, A. 1957. Egg-yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of the goat. Nature 179 : 318.
- 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. 1988. SAS/STAT User's Guide Release 6.03 ed. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Waide, Y., T. Niwa and R. Asanuma. 1977. Studies on the preservation of liquid and frozen semen of domestic animals. III. Viability and fertility of frozen goat spermatozoa. Jpn. J. Anim. Reprod. 23 : 129~137.

Effects of Dilution and Freezing Process on Survival Rate and Motility in Frozen-Thawed Goat Semen⁽¹⁾

Jenn-Rong Yang⁽²⁾, Jan-Chi Huang⁽²⁾
and Ming-Chiang Hsieh⁽²⁾

Received Jan. 19, 1999; Accepted Feb. 22, 1999

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of several factors during dilution and freezing procedure on the survival rate and the motility of spermatozoa in frozen-thawed goat semen. Semen was collected from Alpine and Saanen bucks by using artificial vagina. Concentration and motility of sperm, and percentage of live sperm were measured by sperm analyzer (Hamilton-Thorn HTM-C model). Semen were finally diluted to contain 1.5×10^8 spermatozoa/straw. Factors affecting the qualities of frozen-thawed semen were examined as follows: (1) keeping semen intact or removal of seminal plasma by centrifugation before dilution. (2) using 10% of skim milk or 20% of egg yolk-sodium citrate in the first diluent. (3) using 3.5% or 7.0% of glycerol in the final dilution. (4) loading into 0.25 ml or 0.5 ml of straw for freezing. (5) freezing stepwise before the straw was plunged into liquid nitrogen: -80°C for 2 minutes then -110°C for 3 minutes (two steps) or -80°C for 10 minutes (one step). The results of this experiment were: (A) the survival rate and motility of sperm in the frozen-thawed semen diluted with skim milk were significantly higher than those diluted with egg yolk-sodium citrate diluent irrespective of existence or removal of seminal plasma before dilution ($P < 0.01$) ($57.5 \pm 11.9\%$ vs. $17.5 \pm 10.1\%$; 2.9 ± 0.5 vs. 1.3 ± 0.5 , respectively). (B) existence of seminal plasma did not affect the survival rate and motility of sperm in skim milk diluted semen both in prefreezing and post thawing stages. (C) although the survival rate of semen was not affected by the concentration of glycerol,

(1) Contribution No. 939 from Taiwan Livestock Research Institute, Council of Agriculture.

(2) Heng-Chun Branch Institute, TLRI, COA, Heng-Chun, Ping-Tung, Taiwan, R.O.C.

the motility of sperm in the group of 7.0% glycerol was significantly higher than that in 3.5% glycerol group ($P < 0.05$) (3.1 ± 0.5 vs. 2.4 ± 0.3 , respectively). (D) survival rate and motility of semen frozen by two steps were significantly higher than the one step did ($P < 0.01$) ($58.5 \pm 12.1\%$ vs. $22.9 \pm 11.9\%$; 3.0 ± 0.5 vs. 1.6 ± 0.4 , respectively). (E) no significant differences in the survival rate or the motility were observed between groups with different loading volumes of straw. The fertility of frozen-thawed semen was proven good by artificially inseminating two herds of doe with a result of 36.8% and 30.6% conception rate. These results demonstrated that goat semen together with seminal plasma diluted with 10% of skim milk containing 7.0% of glycerol, then loaded in 0.25 ml or 0.5 ml of straw, and frozen by two freezing steps were the optimal treatments for freezing goat semen.

Key words : Goat, Semen, Dilution, Freezing.