

# 精子濃度與個體因素對豬精子冷凍解凍後存活率之影響<sup>(1)</sup>

王錦盟<sup>(2)</sup> 陳裕信<sup>(3)(4)</sup> 張雁智<sup>(2)</sup> 粘碧珠<sup>(2)</sup> 胡見龍<sup>(2)</sup> 陳立人<sup>(3)</sup>

收件日期：104 年 4 月 20 日；接受日期：105 年 3 月 30 日

## 摘 要

本試驗之目的在探討豬冷凍精液濃度與公豬個體因素對解凍後精子存活率的影響。以彰化種畜繁殖場之公豬為試驗動物，進行豬冷凍精液製備，解凍後進行人工授精試驗，其受胎率與產仔頭數分別為 67% (8/12) 與  $9.4 \pm 2.4$  頭/胎。另於 A 與 B 民間場進行人工授精試驗，其受胎率/產仔頭數分別為 66.7% (8/12) /  $9.2 \pm 2.4$  頭/胎與 57.1% (4/7) /  $12.0 \pm 2.2$  頭/胎，得到類似的結果。顯示以本試驗製程製作的豬冷凍精液，解凍後具有受精能力，可使母豬受胎並產出後裔。另採集 6 頭杜洛克公豬精液經稀釋後以等濃度等比率混合，再調整濃度使製成豬冷凍精子最終濃度分別為 13.1、10.0、7.8、6.4 與  $5.6 \times 10^8$  精子/mL。經解凍後濃度  $6.4 \times 10^8$  精子/mL 的精子存活率最高為  $43.3 \pm 9.0\%$ 。另採集 7 頭藍瑞斯與 17 頭杜洛克精液為試驗材料，分別製成高精子濃度  $10.0 \times 10^8$  與低精子濃度  $6.4 \times 10^8$  精子/mL 的冷凍精液，解凍後低精子濃度的存活率為  $36.3 \pm 2.9\%$ ，比高精子濃度的  $25.8 \pm 2.7\%$  為佳。又活精子比率 30% 以下的頭數比值，在高與低精子濃度分別為 10/24 (41.7%) 與 6/24 (25.0%)。結果顯示在此冷凍精液製作條件下，高濃度之豬冷凍精液解凍後的精子存活率較低，而個體因素造成解凍後豬精子存活率偏低的公豬比率為 25%。

關鍵詞：公豬、精液、冷凍、受胎率、產仔頭數。

## 緒 言

精液冷凍保存技術原理是利用液態氮、乾冰或其他冷凍源，將精子經過適當的處理使其代謝停止，再回溫後恢復活性以達到長期保存的目的。使用冷凍精液時，先解凍冷凍精液，再進行人工授精或體外受精，可以有效提高種公畜的利用率，減少公畜的飼養量，節省飼養成本及縮短地區與時間的限制。自從 Polge *et al.* (1949) 將甘油應用於精子冷凍保存後，於 1951 年產下第一頭犢牛。而豬冷凍精液技術始於 1956 年 Polge 首次報告用豬冷凍精液進行人工授精獲得仔豬。直到 1975 年，公豬冷凍精液始被廣泛應用於現場研究 (Johnson *et al.*, 2000)。Pursel and Johnson (1975) 報告中利用顆粒狀冷凍精液解凍後供 26 頭女豬進行人工授精，剖檢後有 22 頭 (85%) 女豬形成受精卵，且正常發育的受精卵為 87%。德國 Westendorf *et al.* (1977) 製作麥管式豬冷精液，其解凍後之受胎率為 67%，此結果與粒狀冷凍精液類似。在 1980 年召開的第九屆國際動物繁殖和人工授精會議上，日本學者報告了歐亞 7 國在 1977 — 1979 年豬冷凍精液的人工授精情況，其中美國、瑞士、法國、匈亞利與西班牙利用冷凍精液進行配種達 800 — 1,000 頭，英國、澳大利亞使用冷凍精液配種 50 — 200 頭 (Johnson *et al.*, 2000)。而 Eriksson *et al.* (2002) 利用 5 mL 麥管製作豬冷凍精液，分娩率達 73%，平均窩產仔數達 10.7 頭。臺灣的豬冷凍精液，鄭等於 1975 首次提出報告，製作粒狀冷凍精液，其解凍後進行人工授精的分娩率與產仔頭數分別為 48.3% 與 8.0 頭/胎。另一方面，郭等 (1981) 以進行麥管式豬冷凍精液製作，解凍進行授精之受孕率為 71%，平均產仔數為 7.8 頭，此結果與粒狀冷凍精液類似。郭及楊 (1997) 之研究認為高頻度對解凍後之冷凍精液品質和授精後的黃體數未造成負面影響，反而有較好的趨勢。在解凍稀釋液方面，使用 Beltsville thaw solution (BTS) 解凍稀液對解凍後之豬精子存活率、精子總活力、精子快速前進式活力均顯著優於 Kiev 稀釋液，且不亞於 Lactose-egg yolk 及 Androhep 稀釋液 (章及吳 2010)。在應用上，麥管式冷凍精液的製作時間與費用均較粒狀冷凍精液為低 (郭等，1981)，且解凍方式相對較簡單且不易被污染，且較容易被養豬業者接受，目前製作豬冷凍精液以麥管式為主。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 2386 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所 彰化種畜繁殖場。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所 生理組。

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

在超低溫冷凍時，凍結狀態對精子活力影響很大，冰點以下的溫度會造成精子死亡。雖然對冷凍過程中生物細胞內外所發生的理化變化，及引起細胞損傷機制迄今尚未全然了解，但基本變化可以歸類為細胞內外溶質濃度和滲透壓增高；細胞脫水，蛋白質變性，特別是細胞的膜結構受到損傷；解凍時細胞遭到同樣危害 (Thurston *et al.*, 2003)。在家畜中，牛和馬精子的耐凍性較強，豬精子極不耐凍，在冷凍和解凍之後，其精子頭核、頸部和尾部總體結構變化不大，但由於細胞膜內脂類 - 蛋白的結合發生改變，細胞膜的通透性增加，以致氨基酸、脂肪酸和有關酶損失，從而造成精子頭部外形頂體膨脹、脫落，出現皺褶突起與細胞膜破損 (Woelders *et al.*, 2005)。因此在現場使用上，以豬冷凍精液進行人工授精的受胎率普遍較低，約為新鮮精液的 80%，產仔頭數亦較新鮮精液約減少 2 — 3 頭，因此限制了豬冷凍精液的應用 (Lisa *et al.*, 2003; Woelders *et al.*, 2005)。經過前人多年的研究與應用，在資料的累積與技術方面有很多進展。目前豬冷凍精液的製作以 5 mL/劑為主，豬冷凍精液品質受冷凍保護劑種類、公豬個體與製作流程等因素的影響。Woelders *et al.* (2005) 指出以 BTS — 蛋黃配方製作豬冷精液，較高精子濃度 ( $1.5 \times 10^9$  精子/mL) 的冷凍精液，解凍後的精子存活率較低，但精子濃度的效應在 Lactose — 蛋黃配方則較不明顯，其認為提高精子濃度至  $1.5 \times 10^9$  精子/mL，對解凍後精子品質具有負面的效應。為了解豬冷凍精液濃度與公豬個體因素對解凍後精子存活率的影響，本試驗先建立豬冷凍精液製作流程並進行人工授精試驗，先確定製作之冷凍精液能使種母豬受胎並產出後裔後，進而對豬冷凍精液濃度與公豬個體等因素進行探討。

## 材料與方法

### I. 豬冷凍精液人工授精試驗

#### (i) 豬冷凍精製作條件

所採集的豬精液經鏡檢後，並以 SQA-VP<sup>®</sup> 豬精液測定儀 (Medical Electronic Systems, Austria) 測定品質，取用活動精子率達 80% 以上的公豬精液，以 M III (Minitube, Germany) 新鮮精液稀釋液進行等比例混合稀釋，冷卻至 15°C (2 h)。將稀釋精液離心 ( $1,000 \times g/10$  min)，去除上清液，加入自行配製之 BF5 冷凍稀釋保護劑 (Pursel and Johnson, 1975) 進行稀釋後，冷卻至 5°C (2.5 h)，加入含 9% 甘油之冷凍稀釋保護液，加入量為總量的 1/3，使豬精子最終濃度分別為  $10.0 \times 10^8$  精子/mL，再填入 5mL 麥管中，將麥管置於液態氮程式降溫儀 (Ice cube 14S, Minitube, Germany) 中，降溫至 -120°C 後，將冷凍之麥管移入液氮桶內貯存。

#### (ii) 人工授精試驗

採集彰化種畜繁殖場 (以下稱彰化場) 杜洛克 (Duroc) 豬精液，依上述方法製成濃度為  $10.0 \times 10^8$  精子/mL (每劑 5 mL) 的冷凍精液。冷凍精液經以 50°C /45 sec, 30°C /5 min 二階段式解凍後，以莫克 (Merk<sup>®</sup>) 新鮮精液稀釋液稀釋為 30 mL，於顯微鏡下以鏡檢方式測定精子存活率後，再以彰化場的藍瑞斯母豬進行人工授精試驗，測定受胎率與產仔數。另採集 A 與 B 兩場民間豬場之藍瑞斯豬精液製成冷凍精液，並分別由 A 與 B 兩場民間豬場各自進行人工授精試驗，測定受胎率與產仔數。

### II. 測定冷凍精子濃度對解凍後精子存活率

以彰化場購自檢定站之杜洛克公豬精液為試驗材料，於涼季所採集的精液經鏡檢後，並以 SQA-VP<sup>®</sup> 豬精液測定儀進行豬精液品質測定，以活動精子率達 80% 以上為標準，取用杜洛克公豬精液共 6 頭，以默克 (Merk<sup>®</sup>) 新鮮精液稀釋液進行稀釋，使精子濃度為  $1.4 \times 10^8$  精子/mL，進行等比率混合後，以上述方法 I (i) 進行冷凍精液製作，經稀釋、冷卻、離心、去除上清液，加入冷凍稀釋保護劑、加入含甘油之冷凍稀釋保護液等步驟，使豬精子最終濃度分別為 13.1、10.0、7.8、6.4 與  $5.6 \times 10^8$  精子/mL，再分別填入 5 mL 麥管中，每種濃度 3 重複，共計 15 支。將麥管置於降溫儀中進行冷凍，製作完成後移入液氮桶內貯存。

冷凍精液經以 50°C /45 sec, 30°C /5 min 二階段式解凍後，以 Merk<sup>®</sup> 稀釋液稀釋為 30 mL，以螢光染色劑 SYBR-14 和 Prodidium Iodide (PI) (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 進行染色後，經螢光染色以鏡檢方式在可見光波長 488 nm 下檢視精子存活狀況，呈綠色螢光者為活精子，而細胞膜有破損的細胞會呈紅色螢光者是死精子，以計算死與活精子之間的比率與精子存活率。

### III. 公豬個體因素對豬冷凍精液影響

以彰化場購自檢定站的公豬為試驗動物，於涼季分批進行手握式採精，每頭公豬採精頻率為間隔 5 — 7 天，共採集 7 頭藍瑞斯與 17 頭杜洛克之精液。採集之精液經鏡檢後，使用莫克 (Merk<sup>®</sup>) 稀釋液將精液稀釋為  $1.4 \times 10^9$  精子/mL 後，冷卻至 15°C (2 h)，調整最終精子濃度分別為 10.0 與  $6.4 \times 10^8$  精子/mL，再依上述方法 I (i) 製作豬冷凍精液，進而以鏡檢方式測定精子存活率。每頭公豬以此方式製作冷凍精液 3 次並分別測定其解凍後之活精子比率，由於一般種豬業者對豬冷凍精液解凍後活精子比率 30% 以下的接受度較低，因此若活精子比率均

未達 30% 以上，則判定為活精子比率相對較少。

## VI. 統計分析

以 SAS<sup>®</sup> 套裝軟體 (SAS Institute, 2005) 進行一般線性模式 (General Linear Model procedure) 分析處理效應，以 Tukey's Studentized Range Test 比較各組間的差異顯著性。

# 結果與討論

## I. 豬冷凍精液配種成績

本試驗製作之冷凍精液，進行人工授精試驗，其受胎率與產仔頭數分別為 67% (8/12)，為  $9.4 \pm 2.4$  頭 / 胎 (mean  $\pm$  SD)，顯示以本試驗製作的冷凍精液，解凍後具有受精能力，可使母豬受胎並產出後裔。此成績與 Westendorf *et al.*, (1977) 和郭等 (1981) 之結果類似。另於 A 與 B 民間場進行人工授精試驗，其受胎率分別為 66.7 (8/12) 與 57.1 (4/7)%，產仔頭數則分別為  $9.4 \pm 2.4$  與  $12.0 \pm 2.2$  頭 / 胎。

## II. 冷凍精子濃度對解凍後精子存活率的影響

不同濃度豬冷凍精液經解凍後，分別以螢光方法與傳統鏡檢方式測定精子存活率 (表 1)，結果顯示，不論以螢光方法或傳統鏡檢所測得的存活率均以低濃度者較好，兩者具相同趨勢。傳統鏡檢方式的結果顯示，以濃度  $6.4 \times 10^8$  精子 / mL 的精子存活率最高為  $43.3 \pm 9.0\%$  (mean  $\pm$  SE)，且顯著高於  $13.1 \times 10^8$  精子 / mL 的精子存活率  $14.5 \pm 2.9\%$  ( $P < 0.05$ )。以螢光方法的結果顯示，濃度  $5.6 \times 10^8$  與  $6.4 \times 10^8$  精子 / mL 的精子存率分別為  $31.7 \pm 6.0$  與  $33.3 \pm 1.7\%$ ，兩者均顯著高於  $13.1 \times 10^8$  精子 / mL 的精子存活率  $8.3 \pm 1.7\%$  ( $P < 0.05$ )。綜上所述，顯示在此製作條件下，降低豬冷凍精液的最終濃度至  $6.4 \times 10^8$  精子 / mL 可提高解凍後精子的存活率。

以 BTS - 蛋黃配方製作的豬冷凍精液，高精子濃度 ( $15 \times 10^8$  精子 / mL) 對解凍後精子品質具有負面的效應，惟在 Lactose - 蛋黃配方上的效應較小 (Woelders *et al.*, 2005)。本試驗以 BF5 冷凍稀釋保護劑進行豬冷凍精液製作，測定其精子存活率得到類似的結果：高精子濃度 ( $13.1 \times 10^8$  精子 / mL) 對解凍後精子精子存活率具有負面的效應。顯示在目前一般的豬冷凍精液製作條件下，太高的豬冷凍精液濃度對冷凍精液品質為一負面因子。

## III. 公豬個體對冷凍精液存活率的影響

以彰化場分批採集的 7 頭藍瑞斯與 17 頭杜洛克精液為試驗材料，共計 24 頭，精液後進行冷凍精液製作，最終冷凍精液的精子濃度分別為  $10.0$  與  $6.4 \times 10^8$  精子 / mL，解凍後以鏡檢方式檢測精子存活率，結果如表 2。低精子濃度 ( $6.4 \times 10^8$  精子 / mL) 冷凍精液解凍後的存活精子比率為  $36.3 \pm 2.9\%$  高於高精子濃度 ( $10.0 \times 10^8$  精子 / mL) 的存活率  $25.8 \pm 2.7\%$ ，兩者差異為 10.5%。此結果與上述混合精液之結果相似。

表 1. 杜洛克公豬冷凍精液解凍後之精子存活率

Table 1. The percentage of live sperm in the frozen-thawed boar semen Duroc

Concentration (sperm/mL)	Live sperm (%)	
	Fluorescent	Microscopy
$13.1 \times 10^8$	$14.5 \pm 2.9^a$	$8.3 \pm 1.7^a$
$10.0 \times 10^8$	$22.4 \pm 4.5^{ab}$	$16.7 \pm 1.7^{ab}$
$7.8 \times 10^8$	$32.1 \pm 0.2^{ab}$	$21.3 \pm 1.3^{abc}$
$6.4 \times 10^8$	$43.3 \pm 9.0^b$	$31.7 \pm 6.0^{bc}$
$5.6 \times 10^8$	$35.3 \pm 4.5^{ab}$	$33.3 \pm 1.7^c$

Values are expressed as mean  $\pm$  SE.

<sup>a, b, c</sup> Means within the same column without the same superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

表 2. 豬冷凍精液精子濃度對解凍後精子存活率的影響

Table 2. Effect of sperm concentration on the ratio of live sperm in the frozen-thawed boar semen

Concentration (sperm/mL)	Live sperm (%)
$10.0 \times 10^8$	$25.8 \pm 2.7$
$6.4 \times 10^8$	$36.3 \pm 2.9$

Values are expressed as mean  $\pm$  SE, n = 24.

total of 24 boars were used, including 7 Landrace and 17 Duroc.



公豬新鮮精液及冷凍精液品質可因個體因素而呈現顯著的不同 (Kumirud *et al.*, 2002; Roca *et al.*, 2006; Hernández *et al.*, 2007)，此種差異可能由於不同樣品間的差異或是個體差異所造成 (Waterhouse *et al.*, 2004)。本試驗解凍後活精子比率 30% 以下的頭數比值，在高精子濃度者為 10/24 (41.7%) 高於低精子濃度的 6/24 (25.0%)。由於一般種豬業者對豬冷凍精液解凍後活精子比率 30% 以下的接受度較低，表示彰化場購自檢定站的公豬，在此冷凍精液製作條件下，由於個體因素而造成解凍後豬精子存活率偏低的公豬比率為 25% (6/25)。此結果不僅提供個體因素造成豬冷凍精液品質差異的證據，同時顯示，在本試驗的冷凍精液製作條件下，因個體因素造成解凍後豬精子存活率偏低的公豬比率可達 25%。欲降低個體因素造成冷凍精液品質下降的比率，則可由冷凍精液製作技術、條件與育種等方面著手。

## 誌 謝

試驗期間承蒙彰化種畜繁殖場與畜產試驗所生理組同仁協助試驗進行始得完成，謹致謝忱。

## 參考文獻

- 郭有海、戈定軍、沈冠雄。1981。粒狀及麥管式冷凍公豬精液對其生育能力之影響。中國畜牧學會會誌 10：53-60。
- 郭有海、楊天樹。1997。不同採精頻度對 10 月齡和 24 月齡公豬新鮮和冷凍精液品質及其生育能力之影響。臺灣畜牧獸醫學會會報 67：45-50。
- 章嘉潔、吳昇陽。2010。豬冷凍精液解凍稀釋液之研究。畜產研究 43(1)：21-30。
- 鄭三寶、戈定軍、郭有海。1975。公豬冷凍精液之研究 I. 濃縮處理、稀釋液和解凍液對精蟲生存率之影響。臺糖畜產研究所 64/65 年期研究報告，p. 7-23。
- Eriksson, B. M., H. Petersson and H. Rodriguez-Maryinez. 2002. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. *Theriogenology* 58: 1065-1079.
- 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.
- Johnson, L. A., K. F. Weitze, P. Fiser and W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 143-172.
- 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.
- Lisa, M. T., V. H. William and F. W. Paul. 2003. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology* 60: 101-113.
- Polge, C., A. U. Smith and A. S. Park. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666.
- Polge, C. 1956. Artificial insemination in pigs. *Vet. Rec.* 68: 62-76.
- 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.
- Roca, J., M. Hernández, G. Carvajal, J. M. Vázquez and E. A. Martínez. 2006. Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.* 84: 2692-2699.
- Thurston, L. M., W. V. Holt and P. F. Watson. 2003. Post-thaw functional status of boar spermatozoa cryopreserved using three controlled rate freezers: a comparison. *Theriogenology* 60: 101-113.
- 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.
- Westendorf, P., L. Richter and H. Treu. 1975. Deep freezing of boar sperma. Laboratory and insemination results using the Hülsenberger paillette method. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 82(7): 261-267.
- Woelders, H., A. Matthijs, C. A. Zuidberg and A. E. N. Chaveiro. 2005. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws. *Theriogenology* 63: 383-395.

# The effects of semen concentration and individual boars on the frozen-thaw sperm viability <sup>(1)</sup>

Chin-Meng Wang <sup>(2)</sup> Yu-Hsin Chen <sup>(3)(4)</sup> Yen-Chih Chang <sup>(2)</sup> Pi-Chu Nien <sup>(2)</sup>  
Chien-Lung Hu <sup>(2)</sup> and Li-Ren Chen <sup>(3)</sup>

Received: Apr. 20, 2015; Accepted: Mar. 30, 2016

## Abstract

The purposes of this study were to evaluate the effect of both of boar and frozen boar semen concentration on the frozen-thaw sperm viability. The freeze boar semen were produced using boars from Changhua Animal Propagation Station and than thaw and insemination. The conception rate and litter size were 67% (8/12) and  $9.4 \pm 2.4$  fetus/pig. The similar results were gotten from 2 farms. Another way the 6 Duroc semen samples were mixed with same concentration and then frozen at 13.1, 10.0, 7.8, 6.4 and  $5.6 \times 10^8$  sperms/mL concentration. After frozen-thaw, the viability of sperm using fluorescent method shows that the  $6.4 \times 10^8$  sperms/mL concentration frozen-thaw semen had  $43.3 \pm 9.0\%$  live sperm, significant higher than the  $13.3 \times 10^8$  sperms/mL concentration,  $14.5 \pm 2.9\%$  ( $P < 0.05$ ). On the other study, the 24 semen samples were collected from 7 Landrace and 17 Duroc boars. High and low frozen semen concentrations, 10.0 and  $6.4 \times 10^8$  sperms/mL, were made at each sample. The viability of sperm in the frozen-thaw semen was determined by microscopy method, the result shows that the low concentration samples had 36.3% motile sperm higher than the high concentration 25.8%. The number and ratio of the boars having lower than 30% motile sperm were calculated and the ratios of boar at high and low concentration were 41.7% (10/24) and 25.0% (6/24). However, it seems that using our program to make frozen boar semen, the frozen-thaw semen at high concentration had lower live sperm ratio. The boar effect bring out lower ratio live sperm in frozen-thaw semen was not less than 25%.

Key words: Boar, Semen, Cryopreservation, Conception rate, Litter size.

---

(1) Contribution No. 2386 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.

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

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

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