

猪精液预处理稀释液与冷冻基础液的配伍效应

胡建宏¹, 李青旺^{1, 2}, 江中良¹, 杨海^{1, 2}

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 燕山大学 环境与化学工程学院, 河北 秦皇岛 066004)

[摘要] 采用6种预处理稀释液对猪精液进行预处理, 然后用3种冷冻基础液冷冻保存, 研究精液预处理稀释液和冷冻基础液对精子冷冻保存效果的影响, 以及其间的配伍效应。结果表明, 不同的预处理稀释液对解冻后精子活力的影响差异显著($P < 0.05$), 而3种冷冻基础液对冻后精子活力的影响差异不显著($P > 0.05$)。不同的预处理稀释液与冷冻基础液之间存在明显的配伍效应, 并且用含甘油的稀释液对平衡不同时间的精液冷冻时, 其配伍效应又有所不同。猪精液中去除精清可显著提高精子冻后活力和顶体完整率($P < 0.05$), 有利于提高精液品质。

[关键词] 猪精液; 预处理稀释液; 冷冻基础液; 配伍效应

[中图分类号] S828.3⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)11-0021-06

自20世纪50年代科学家Pologe^[1]首次报道用猪冷冻精液人工授精成功获得仔猪后, 因猪人工授精技术在降低公猪饲养成本、提高母猪繁殖力、扩大优良种猪利用效率等方面具有极大优势, 而引起各国科学家的高度关注。近年来, 随着人们生活水平的不断提高以及畜牧业向产业化、规模化、工厂化方向的迅猛发展, 尤其在世界各国充分享用优良种猪遗传资源方面, 用猪冷冻精液进行人工授精显示出良好的发展前景和巨大的生产潜力^[2-3]。但是, 与液态保存的精液和自然交配相比, 猪冷冻精液人工授精由于存在妊娠率低、产仔数少等缺陷, 极大地限制了猪冷冻精液的推广和应用^[4-5], 与目前应用甚广的牛冷冻精液相比差异较大^[6]。在优良种猪的繁殖方面, 利用猪冷冻精液进行人工授精仍非常有限, 大多数国家或地区应用的仍然是16~20 保存的液态精液^[7]。

与牛等其他家畜相比, 猪精子由于结构和细胞成分的特殊性, 致使猪冷冻精液的品质一直难以提高, 而在实际生产中无法大面积推广应用。在现今国内外猪冷冻精液的研究报道中, 众多学者致力于稀释液的筛选、精子冻后结构的变化以及实验室条件下猪精液的冷冻技术研究^[8-11]。国内外学者基本上都是将所采集的精液稀释后进行冷冻, 并且大多研究是分别筛选稀释液和冷冻基础液, 而对于利用不

同稀释液进行预处理后, 稀释液与冷冻基础液之间的配伍效应未作详细研究, 从而在一定程度上影响了猪冷冻精液的质量。本试验将用不同稀释液预处理的猪精液, 再用不同冷冻基础液进行交叉配伍冷冻, 探讨了目前常用的猪精液预处理稀释液与冷冻基础液之间的配伍效应, 以期猪冷冻精液品质的提高提供新方法。

1 材料与方法

1.1 器械与试剂

1.1.1 器械 生物冷冻仪(BDTRONICS LMTED, 英国); 超低温温度计(600-1010K型, 美国Barnant公司); 荧光显微镜(COIC, BE2000, 日本); 电子天平(ESJ-182D, 沈阳龙腾电子有限公司); 高压消毒柜(HIRAYAMA, HVE-50, 日本); 全自动高速离心机(Heraeus, 德国); 自动三重纯水蒸馏器(SZ-97型, 上海精密实验设备有限公司)。

1.1.2 试剂 D-葡萄糖、Tris(Amresco进口分装); 乳糖(北京奥博星生物技术责任有限公司); 柠檬酸钠、果糖、牛血清白蛋白(Sigma进口分装); L-甘氨酸(北京鼎国生物中心); 柠檬酸(北京世纪星化工有限责任公司); 甘油(天津巨星盛源化学试剂有限公司)。

〔收稿日期〕 2005-10-27

〔基金项目〕 西北农林科技大学科研专项(05ZR100); 陕西省科技攻关项目(2004K02-G11-03, 2005K02-G03-03)

〔作者简介〕 胡建宏(1969-), 男, 陕西白水人, 副研究员, 博士, 主要从事动物生殖生理与调控技术研究。

〔通讯作者〕 李青旺(1956-), 男, 陕西米脂人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物生殖生理与调控技术研究。

1.2 精液的采集及其品质评定

选取河北秦皇岛市抚宁县瘦肉型种猪繁育基地的1.5~2岁、体格健壮、膘情中等、性欲旺盛的杜洛克和约克夏种公猪,参照Eriksson等^[12]的方法,并稍加改进,利用手握法采集公猪射精中间浓厚段精液。精液采集后,立即在35~38℃条件下进行常规品质评定,将pH值6.3~6.8,精子密度 $3.0\times 10^9/\text{mL}$,活力0.75以上,无异常气味,色泽为乳白色的精液用4层以上的纱布滤去胶体物,32℃恒温条件下1.5h内运回实验室备用。

1.3 精液的稀释与平衡

1.3.1 精液的第1次稀释与平衡 将品质评定合

格的精液运回实验室后,首先进行离心($500\times g$, 10 min),根据试验要求弃掉适量精清,然后进行预处理,即将精液用预处理稀释液(V (预处理稀释液) V (精液)=1:1)稀释,经12~15层纱布包裹后缓慢降温至15℃,平衡3h,降温速度约为 $0.1^\circ\text{C}/\text{min}$ 。本研究所用精液预处理稀释液分别为BTS(B1),Zorlesco(B2),Androhep(B3),Schonow(B4),葡-咖-丙(B5)和葡-柠-EDTA(B6)6种^[11,13-14],并进行了适当完善,其配方见表1。

另外,在精液冷冻时,将预处理时离心后的精清去留体积分数分别设置100%,50%和0%3个水平,以研究精清对猪精子冷冻效果的影响。

表1 猪精液预处理稀释液的配方

Table 1 Compositions of boar semen pretreatment extender							g/L
组分 Component	配方 Compositions						
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	
葡萄糖 Glucose	37.0	11.5	26.0	40.0	2.18	60.0	
EDTA (Sodium)	1.3	2.3	2.4	2.0		3.68	
柠檬酸钠 Sodium-citrate	6.0	11.7	8.0	3.7		3.76	
NaHCO ₃	1.3	1.25	1.2			1.2	
KCl	0.8			1.2	0.22		
NaCl					6.61		
CaCl ₂ ·2H ₂ O					1.1		
丙酮酸钠 Sodium pyruvic acid					0.55		
三(羟甲基)氨基甲烷 Tris		6.5			2.42		
4-羟乙基哌嗪乙磺酸 Hepes			9.0				
柠檬酸 Citric acid		4.1					
牛血清白蛋白BSA		5.0	2.5		1.0		
咖啡因 Caffeine					0.21		
半胱氨酸 Cysteine		1.0					
青霉素G Penicillin G	0.6			0.6	0.6	0.6	
链霉素 Streptomycin	1.0			1.0	1.0	1.0	

1.3.2 精液的第2次稀释与平衡 在结合国内外研究基础上,本试验选用TCG(A1),TCF(A2)和葡-乳-柠-甘油(A3)3种稀释液作为冷冻基础液^[15-17],

其配方见表2。冷冻基础液中分别添加体积分数20%的卵黄后即为I液,I液中加入甘油后即为II液。甘油的终浓度为体积分数3%。

表2 猪精液冷冻基础液的配方

Table 2 Compositions of boar semen freezing extender								g/L
冷冻基础液 Extender of freezing	成分 Compositions							
	葡萄糖 Glucose	果糖 Fructose	乳糖 Lactose	柠檬酸钠 Sodium-citrate	柠檬酸 Citric acid	Tris	L-甘氨酸 L-Glycin	
A1	11				14.8	24.2		
A2		11			14.8	24.2		
A3	21		30	3.1			8	

首先将经过第1次稀释、平衡的精液进行离心(17°C , $800\times g$, 10 min),弃掉上清液,用预热的I液(V (精液) V (I液)=1:1)进行等温稀释,稀释后的精液置于储精瓶中,用8~10层纱布包裹储精瓶,在2~5℃的冰箱中,以大约 $0.08^\circ\text{C}/\text{min}$

的降温速度从15℃降至5℃,平衡1.5~3h。

1.3.3 精液的第3次稀释与平衡 将经过第2次稀释、平衡的精液按照 V (精液) V (II液)=2:1的比例用等温II液稀释后,放入2~5℃的冰箱中平衡,根据试验要求平衡不同时间,然后进行冷冻。

1.4 细管冻精的制作

在2~ 5 ℃的环境下,通过专用注射器将精液迅速吸入0.25 mL 的细管内,然后用封口机快速封管。冷冻前,将超低温温度计的探针与冷冻槽连接,并将冷冻槽浸入液氮中预冷,直至液氮不沸腾为止,然后将冷冻槽上提,在距离液氮面1~ 3 cm 处盖上盖子,待温度恒定且达到始冻温度要求后打开盖子,将精液细管放进冷冻槽进行冷冻,要求始冻温度为- 120 ℃。精液完成冷冻后熏蒸5 min,最后将细管冻精浸入液氮内。

1.5 精子活力的镜检

将制作好的细管冻精在38 ℃的水浴锅中解冻30 s 后,按照V (精液) : V (解冻液)= 1 : 10 的比例用解冻液(体积分数95% 相应的预处理稀释液+ 体

积分数5% I 液)^[12]稀释后,在37 ℃的温水中孵育20 min,取10 μL 精液用荧光显微镜(400 ×)检查精子活力。活力达0.3 以上者,装入编号的纱布袋内,浸入液氮中保存备用。

1.6 数据处理

用SPSS 软件对数据进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 II 液平衡5~ 10 min 精液预处理稀释液与冷冻基础液之间的配伍效应

将经过甘油最后一次稀释并且平衡5~ 10 min 的精液用细管法进行冷冻,解冻后精子的活力见表3,其多重比较结果见表4。

表3 II 液平衡5~ 10 min 冷冻- 解冻后猪精子的活力

Table 3 Boar sperm motility after frozen-thawed with 5- 10 min balancing by the II extender

冷冻基础液 Extender of freezing	预处理稀释液 Extender of pre treatment						平均活力 Average motility
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	
A 1	0.247 ± 0.049	0.351 ± 0.033	0.409 ± 0.028	0.411 ± 0.024	0.406 ± 0.039	0.402 ± 0.029	0.371
A 2	0.213 ± 0.041	0.306 ± 0.019	0.301 ± 0.041	0.401 ± 0.033	0.393 ± 0.038	0.391 ± 0.041	0.334
A 3	0.401 ± 0.033	0.408 ± 0.045	0.383 ± 0.029	0.301 ± 0.087	0.382 ± 0.019	0.252 ± 0.101	0.355
平均活力 Average motility	0.287	0.355	0.364	0.371	0.394	0.348	

表4 II 液平衡5~ 10 min 不同预处理稀释液间精子活力的多重比较

Table 4 Multiple comparisons of motility of boar sperm balanced 5- 10 min by the II extender among pretreatment extenders

预处理稀释液 Extender of pretreatment	X_j	$X_j - 0.287$	$X_j - 0.348$	$X_j - 0.355$	$X_j - 0.364$	$X_j - 0.371$
B5	0.394	0.107* *	0.046*	0.039*	0.030*	0.023
B4	0.371	0.084*	0.023*	0.016	0.007	
B3	0.364	0.077*	0.016	0.009		
B2	0.355	0.068	0.007			
B6	0.348	0.061				
B1	0.287					

注: * 表示差异显著($P < 0.05$); ** 表示差异极显著($P < 0.01$)。表6 同。

Note: * differ significantly ($P < 0.05$); ** differ significantly ($P < 0.01$). The table 6 is same

从表3 和表4 可以看出,A 1、A 2 和A 3 3 种冷冻基础液对冷冻- 解冻后猪精子活力的影响差异不显著($P > 0.05$),精子平均活力分别为0.371、0.334 和0.355。B 1、B 2、B 3、B 4、B 5 和B 6 6 种精液预处理稀释液对冻后精子活力影响显著($P < 0.05$),精子平均活力分别为0.287、0.355、0.364、0.371、0.394 和0.348,表明精液冻前预处理对冻后精子活力有较大影响。在6 种预处理稀释液中,B 4 预处理稀释液与冷冻基础液A 1 的配伍效应较好,冻后精子活力最高,为0.411 ± 0.024,而B 4 与A 3 的配伍效应较差;配伍

效应最差的是B 1 预处理稀释液与A 2 冷冻基础液,冻后精子活力为0.213 ± 0.041,说明猪精液超低温冷冻时,不同预处理稀释液与冷冻基础液之间存在明显的配伍效应。

2.2 II 液平衡2~ 3 h 精液预处理稀释液与冷冻基础液之间的配伍效应

将经过甘油最后一次稀释且平衡2~ 3 h 的精液用细管法进行冷冻,解冻后精子活力见表5,其多重比较结果见表6。

表5 II液平衡2~3 h 冷冻-解冻后猪精子的活力

Table 5 Boar sperm motility after frozen-thawed with 2-3 h balancing by the II extender

冷冻基础液 Extender of freezing	预处理稀释液 Extender of pre treatment						平均活力 Average motility
	B1	B2	B3	B4	B5	B6	
A1	0.473 ± 0.025	0.100 ± 0.000	0.390 ± 0.010	0.200 ± 0.000	0.400 ± 0.000	0.400 ± 0.010	0.327
A2	0.397 ± 0.006	0.403 ± 0.006	0.397 ± 0.006	0.100 ± 0.000	0.200 ± 0.000	0.403 ± 0.006	0.317
A3	0.467 ± 0.029	0.383 ± 0.006	0.303 ± 0.006	0.400 ± 0.000	0.387 ± 0.006	0.200 ± 0.100	0.357
平均活力 Average motility	0.446	0.295	0.363	0.233	0.329	0.334	

表6 II液平衡2~3 h 不同精液预处理稀释液间精子活力的多重比较

Table 6 Multiple comparisons of motility of boar sperm balanced 2-3 h by the II extender among pretreatment extenders

预处理稀释液 Extender of pretreatment	X_j	$X_j - 0.233$	$X_j - 0.295$	$X_j - 0.329$	$X_j - 0.334$	$X_j - 0.363$
B1	0.446	0.213**	0.151**	0.117*	0.112*	0.083
B3	0.363	0.130**	0.068	0.034	0.029	
B6	0.334	0.101*	0.039	0.005		
B5	0.329	0.096	0.034			
B2	0.295	0.062				
B4	0.233					

从表5和表6可以看出,A1,A2和A33种冷冻基础液对冷冻-解冻后猪精子活力的影响差异不显著($P > 0.05$),冻后精子活力分别为0.327,0.317和0.357。B1,B2,B3,B4,B5和B66种预处理稀释液对冻后精子活力有显著影响($P < 0.05$),冷冻-解冻后精子活力分别为0.446,0.295,0.363,0.233,0.329,0.334,表明精液冻前用不同稀释液预处理对冻后精子活力有较大影响。在6种预处理稀释液中,B1预处理稀释液的精子冻后活力最高,B1与冷冻基础

液A1的配伍效应最好,冻后精子活力平均达到0.473 ± 0.025,而B1与A2的配伍效应较差,冻后精子活力较低;精液预处理稀释液B4与冷冻基础液A2的配伍效应最差。由表3和表5可见,在制作猪细管冷冻精液时,精液用II液平衡时间不同,预处理稀释液与冷冻基础液之间的配伍效应也相应发生变化。

2.3 精清对猪冷冻精液品质的影响

不同体积分数精清对猪精液冷冻-解冻后精子活力的影响见表7。

表7 精清对猪冻精品质的影响

Table 7 Effect of seminal plasma on boar semen quality after freezing

精清体积分数/% Percentage of seminal plasma	精子冻后活力 After-sperm motility	顶体完整率/% Acrosomal integrity	畸形率/% Abnormal sperm
100	0.298 ± 0.100 b	50.141 ± 2.290 c	34.035 ± 1.625 a
50	0.331 ± 0.026 b	60.798 ± 4.302 b	33.254 ± 2.321 a
0	0.455 ± 0.006 a	78.392 ± 4.589 a	32.961 ± 2.459 a

注:同一列数据后标不同字母者表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the same column indicate a significant difference within the groups ($P < 0.05$).

从表7可见,当全部去掉精清时,精子冻后活力、顶体完整率均显著高于其他2种处理($P < 0.05$),且其精子畸形率也较低,表明全部去掉精清的冷冻效果较好。

3 讨论与结论

3.1 猪精液预处理稀释液与冷冻基础液之间的配伍效应

甘油是一种常用的渗透性冷冻保护剂,精子暴

露于其中后,甘油瞬间就可渗入精子内,对精子既有保护作用,又有毒性作用。本试验结果表明,采用甘油作为冷冻保护剂对猪精液具有较好的保护作用,这与邵秀林等^[18]、李青旺等^[19]的研究结果一致。但在甘油平衡时间上,A lvarez 等^[20]研究表明,0.5~75 min的平衡时间对冻后精子存活参数并无显著影响,但若平衡时间过长,则精子顶体和膜结构均会因甘油的毒性作用而受到损伤。

本研究中,在精液用含甘油的稀释液稀释、平衡

5~10 min 冷冻条件下,精液预处理稀释液B4(Schonow)与冷冻基础液A1(TCG)的配伍效应最佳,冻后精子活力高,而B1(BTS)与冷冻基础液A2(TCF)的配伍效应最差,冻后精子活力低;在精液用含甘油的稀释液稀释、平衡2~3 h 冷冻条件下,精液预处理稀释液B1(BST)与冷冻基础液A1(TCG)的配伍效应最佳,冻后精子活力高,而B4(Schonow)与冷冻基础液A2(TCF)的配伍效应最差,冻后精子活力低。这说明精液预处理稀释液与冷冻基础液之间,不仅存在明显的配伍效应,而且配伍效应又因精液在含甘油的II液中平衡时间的不同有所差异。

本研究结果表明,3种冷冻基础液对冻后精子活力的影响差异不显著,说明3种冷冻基础液冷冻效果均较好。而精液用6种预处理稀释液处理后,精子冻后活力差异显著,说明精液预处理稀释液是影响冻后精子活力的主导因素之一,并且精液用II液稀释后平衡不同时间时其配伍效应也具有一定差异。精液冷冻基础液与预处理稀释液之间存在明显的配伍效应,在精液冷冻过程中,应根据不同的冷冻程序而采用相应的预处理稀释液与冷冻基础液。关于精液预处理稀释液与冷冻基础液之间的相互关系和作用的具体机理,还有待于进一步深入探讨。

3.2 精清对猪冷冻精液品质的影响

精清成分比较复杂,其包含的多种物质不仅充当精子的载体,而且为精子提供代谢物质^[21]。就精清对精子的作用而言,目前还存在一些分歧,有的学者认为精清的存在有利于精子的存活,而有的研究则表明精清不利于精子的冷冻^[13]。Waberski等^[22]研究发现,精清的存在不仅有利于精子在雌性生殖道的运行及精卵识别和结合,而且有利于精子的存活和获能。张嘉保等^[23]认为,精清在母畜生殖道内

会很快被母畜生殖道内的分泌物所冲淡和稀释,所起作用很小。在精子的冷冻过程中,由于冷冻往往使精子出现一些获能样变化,而精清的存在会加剧这种现象的发生,可造成精子出现典型的“假顶体反应”^[24]。本研究结果表明,全部去除精清的精液冷冻-解冻后精子活力和顶体完整率显著高于未去除精清的精液样品,这与Aurich等^[25]的研究结果一致,表明去除精清后对猪冷冻精液品质有明显的提高和改善作用。在本试验中,精液冷冻前先在精清中平衡一段时间,然后用预处理稀释液进行处理,使精子与精清和预处理的稀释液有一个相互作用的过程,从而为冷冻处理做好准备,收到了良好效果。

3.3 稀释液中添加物对猪冷冻精液品质的影响

精子质膜完整性是影响冻精品质的重要因素之一,本研究在猪精液预处理稀释液B2(Zorlesco)和B5(葡-咖-丙)中分别添加了牛血清白蛋白、咖啡因和半胱氨酸等物质,精子冻后活力较高,这与周佳勃等^[11]、牧人等^[26]的研究结果一致,表明这些添加物均有利于精子质膜的稳定,也可能作用于精细胞的特异受体,激活和影响酶的活性,参与细胞生理代谢,从而发挥对精子的保护作用。但是,尽管B2(Zorlesco)和B5(葡-咖-丙)稀释液均添加有各种营养成分,但用II液稀释平衡2~3 h时,B2(Zorlesco)与冷冻基础液A2(TCF)的配伍效果较好,冻后精子活力高,而B2与冷冻基础液A1(TCG)的配伍效应不佳,精子活力较低。同样,B5(葡-咖-丙)与冷冻基础液A1(TCG)的配伍效果较好,冻后精子活力高,而与冷冻基础液A2(TCF)的配伍效应不佳,精子活力较低。在实际冷冻过程中,应该根据具体情况选用适宜的稀释液和冷冻基础液进行配伍,以取得较好的冷冻效果。

[参考文献]

- [1] Polge C. Artificial insemination in pigs[J]. Vet Rec, 1956, 68: 62-76
- [2] 魏 磊. 提高猪人工授精效果的综合技术探讨[J]. 安徽农业科学, 2004, 32(30): 540-542
- [3] Singleton. State of the art in artificial insemination of pigs in the United States[J]. Theriogenology, 2001, 56: 1305-1310
- [4] Rodriguez Martinez H, Saravia F, Wallgren M, et al. Boar spermatozoa in the oviduct[J]. Theriogenology, 2005, 63: 514-535
- [5] Vazquez J M, Martinez E A, Roca J, et al. Improving the efficiency of sperm technologies in pigs: the value of deep intrauterine insemination[J]. Theriogenology, 2005, 63: 536-547
- [6] Huo Lirun, Ma Xinghong, Yang Zengming. Assessment of sperm viability, mitochondrial activity, capacitation and acrosome intactness in extended boar sperm during long-term storage[J]. Theriogenology, 2002, 58: 1349-1360
- [7] Weitze K F. Update on the worldwide application of swine AI[C]//Johnson L A, Guthrie H D, eds. Boar semen preservation IV. Lawrence, KS: Allen Press, 2000
- [8] Woelders H, Matthijs A, Zuidberg C A, et al. Cryopreservation of boar semen: equilibrium freezing in the cryomicroscope and in straws[J]. Theriogenology, 2005, 63: 383-395

- [9] Gliozzi T M, Luzi F, Cerolini S. Assessment of sperm viability in boar, rabbit and rooster: a modification of the fluorometric ethidium bromide exclusion procedure[J]. *Theriogenology*, 2003, 60: 635-645
- [10] Perez-llano B, Yeneso-garcia P, Garcia-casado P. Four subpopulation of boar spermatozoa defined according to their response to the short hypotonic swelling test and acrosome status during incubation at 37 °C [J]. *Theriogenology*, 2003, 60: 1401-1407.
- [11] 周佳勃, 岳奎忠, 孙兴参, 等. 猪精液冷冻技术的研究[J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(5): 295-299
- [12] Eriksson, Petersson, Rodriguezmartinez. Field fertility with exported boar semen frozen in the new FlatPack container [J]. *Theriogenology*, 2002, 58: 1065-1079
- [13] Johnson, Weitze, Fiser, et al. Storage of boar sperm [J]. *Animal Reproduction Science*, 2000, 62: 143-172
- [14] Kikuchi, Nagai, Kashiwakaj, et al. Cryopreservation and *in vitro* fertilization of pig sperm collected from refrigerated epididymides [J]. *Theriogenology*, 1997, 47: 258
- [15] Cordova, Duclomb, Jimenez, et al. *In vitro* fertilization capacity of frozen-thawed boar sperm [J]. *Theriogenology*, 1997, 47: 1309-1317.
- [16] Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, et al. Bull semen *in vitro* fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender [J]. *Theriogenology*, 2004, 61: 895-907.
- [17] 李青旺, 江中良, 王立强, 等. 猪精液冷冻保存的初步研究[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2003, 31(4): 63-66
- [18] 邵秀林, 龙翔. 不同冷冻保护剂在猪精液冷冻中的作用[J]. *四川畜牧兽医学院学报*, 1998, 12(2): 25-27.
- [19] 李青旺, 王立强, 于永生, 等. 猪精液冷冻技术研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(2): 150-153
- [20] Alvarez, Johnson. Effect of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straw [J]. *Journal of Animal Science*, 1988, 66: 2899-2905
- [21] Risopatron J, Sanchez R, Sepulveda N, et al. Migration/sedimentation sperm selection method used in bovine *in vitro* fertilization comparison with wash/centrifugation [J]. *Theriogenology*, 1996, 46: 65-73
- [22] Waberski, Soarez G, de Arruda B, et al. Effect of a transcervical infusion of seminal plasma on the fertilizing competence of low numbers of boar spermatozoa under controlled Artificial Insemination intervals [J]. *Animal Reproduction Science*, 1996, 44: 165-173
- [23] 张嘉保, 任文陟, 杨勇君, 等. 用去透明带仓鼠卵穿透试验检测牛冷冻精子的受精能力[J]. *黑龙江动物繁殖*, 2001, 9(10): 4-6
- [24] 马毅. 波尔山羊除精浆冷冻精液机理研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2002
- [25] Aurich J E, Kuhne A, Hoppe H, et al. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation [J]. *Theriogenology*, 1996, 46: 791-797.
- [26] 牧人, 张锁链, 王建国, 等. 蔗糖、牛血清白蛋白和锌离子对白绒山羊精液冷冻效果的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 1997, 28(2): 120-125

Research on compatibility effect between pretreatment extenders and cryoprotective extenders in frozen boar semen

HU Jian-hong¹, LI Qing-wang^{1,2}, JIANG Zhong-liang¹, YANG Hai^{1,2}

(1 College of Animal science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Environmental Engineering and Chemical Engineering, Yanshan University, Qinhuangdao, Hebei 066004, China)

Abstract: The purpose of this study was to research the effect of pretreatment extenders and cryoprotective extenders on frozen boar semen and their co-effect. Six home-temp extenders were used in pretreatment and three cryoprotective extenders were used in cryo-preservation in this experiment. The results were as follows: there was significant difference in the frozen-thawed sperm motility among six pretreatment extenders ($P < 0.05$), however, there was no significant difference in the frozen-thawed sperm motility among three cryoprotective extenders ($P > 0.05$). Significant difference existed in compatibility effect between pretreatment and cryoprotective extenders ($P < 0.01$). Different balancing time led to different compatibility effects. The motility and acrosomal integrity of frozen-thawed sperm could be significantly improved by removing the seminal plasma.

Key words: boar semen; pretreatment extender; cryoprotective extender; compatibility effect