

應用流式細胞儀評估拍賣種公豬精液性狀⁽¹⁾

彭麟量⁽²⁾ 林秀蓮⁽²⁾ 賴永裕⁽²⁾ 林德育⁽²⁾ 楊鎮榮⁽²⁾
許順貴⁽³⁾ 劉桂柱⁽³⁾ 郭廷雍⁽²⁾⁽⁴⁾

收件日期：113 年 3 月 11 日；接受日期：113 年 5 月 31 日

摘 要

公豬精液品質直接影響母豬受胎率或產仔數等繁殖性狀，透過公豬精液品質檢測並預測公豬生育力，係維持生產效率避免經濟損失的重要措施。本研究應用流式細胞儀評估參加臺灣區種豬產業協會拍賣之杜洛克與藍瑞斯公豬精液，分析品種、採精日齡、季節等因子對精液性狀的影響，藉以應用至選留產精能力優良種豬。試驗結果顯示藍瑞斯公豬有較高的精液量，但其精液濃度則顯著較杜洛克品種低 ($P < 0.05$)。在採精日齡影響上，超過 300 日齡的杜洛克公豬在精液量、總精子數、精子存活率、頭帽及精子膜完整性等性狀，均顯著高於 240 – 269 日齡與 270 – 299 日齡組別公豬 ($P < 0.05$)，顯示 300 日齡以上杜洛克公豬，相較於年輕公豬具較佳的精液性狀；而採精日齡對藍瑞斯公豬則待更多資料累積再進一步分析。在季節影響上，結果顯示季節影響杜洛克及藍瑞斯公豬的精液性狀，其中以秋季採樣精子染色質結構完整性較差。綜上，研究成果可提供未來評估種豬繁殖與選育應用。

關鍵詞：精液性狀、流式細胞儀、拍賣種公豬、公豬日齡、採精季節。

緒 言

人工授精 (artificial insemination, AI) 技術已廣泛應用於畜牧業，公豬精液稀釋後可配種多頭母豬，加速種畜性能改良 (Heape, 1897)，亦能減少飼養公豬成本。應用人工授精技術前須進行採精及精液檢查，以確保精液品質並避免疾病傳播風險。公豬精液品質若不佳將導致母豬受胎率或產仔數等繁殖效率降低，造成經濟損失，優良種公豬之精液可對眾多母豬進行授精，因此檢測公豬精液品質並預測公豬生育力極為重要，將公豬精液性狀指標併入現代種豬選育架構，能強化種豬性能檢定體系，並減少因選留產精能力不佳種豬所造成之損失。

精液品質分析由傳統目視觀察精液顏色與使用顯微鏡檢測精子活力、精液濃度及精子型態評估等，轉變至今可應用電腦輔助精子分析系統 (computer assisted sperm analysis, CASA) 偵測精子型態、運動軌跡等參數評估精液品質，藉由電腦輔助系統分析降低人為測量誤差並提升分析效率 (Boe-Hansen and Satake, 2019)。此外，隨著技術發展，螢光染色及流式細胞儀分析技術 (flow cytometry analysis) 也被應用於評估精子細胞膜完整性、精子頭帽完整性及粒線體膜電位等檢測 (Celeghini *et al.*, 2007; de Andrade *et al.*, 2007)，強化了精子細微結構之分析。流式細胞儀係利用電子檢測儀器偵測並計算懸浮在流動液體中細胞，短時間內分析上千個粒子，搭配螢光染色技術操作，已應用於牛隻 (Garner *et al.*, 1994; Christensen *et al.*, 2005)、小鼠 (Tao *et al.*, 1993) 及人類 (Purvis *et al.*, 1990) 等物種之精液品質評估。本研究目的為應用流式細胞儀評估種公豬精液性狀，瞭解臺灣區種豬產業協會拍賣種公豬精子性狀概況，並就品種、採精日齡及季節等對種公豬精液性狀的影響作初步評估，以做為未來選留優良產精能力種公豬應用。

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2793 號。
(2) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。
(3) 台灣區種豬產業協會。
(4) 通訊作者，E-mail: tykuo@mail.tlri.gov.tw。

材料與方法

I. 試驗動物

試驗豬隻來源為 2014 與 2015 年參加臺灣區種豬產業協會拍賣會之種公豬，日齡包含 240 – 269 日齡與 270 – 299 日齡之年輕種公豬、300 日齡以上之種公豬，試驗共分析 357 頭杜洛克及 84 頭藍瑞斯公豬之精液性狀，分析項目包含精液量、精子活力、精液濃度、總精子數、精子存活率、頭帽及精子膜完整性、粒線體膜電位及精子染色質結構分析等。

II. 採精、精液保存與檢測樣品製備

(i) 種公豬採精

將公豬趕至採精區域，待其爬跨假母臺後，用生理食鹽水清潔陰囊與陰莖，採精人員以單手抓住公豬陰莖並順勢拉出，一手握住陰莖一手持覆蓋濾網之採精瓶，進行精液收集。採精後去除濾網及殘留膠體，新鮮精液依刻度估計精液量，並將取得之新鮮精液倒入 100 mL 注精瓶內，擠出瓶內氣體後，旋緊上蓋後放入 16°C 保溫箱內，立即攜回實驗室進行分析。

(ii) 精液鏡檢與精液濃度測定

於實驗室內分別將採取 20 μ L 種公豬精液放至於玻片上，以 37°C 培養箱培養 3 分鐘後利用光學顯微鏡進行鏡檢，參照黃 (1995) 分級方法並稍作修正，以顯微鏡觀察精子活力，分為 +++ (激烈運動)、++ (活潑運動)、+ (緩慢運動)，估計各級占比再細分為死精、70+ 以下、70+、70++、70+++、75+++、80+、80++、80+++、85+++、90+、90++、90+++ 及 95+++ 等。本次試驗樣品依前述分級僅有 95+++、90+++、90++、85+++、70+ 等 5 種樣態，並給予對應精子活力，95+++ 為 98%，90+++ 為 93%，90++ 為 92%，85+++ 為 85%，70+ 為 70% 進行統計分析；精液濃度為取原精液填入量測晶片中，以精子計數器 (SpermaCue, Minitub, Germany) 進行量測；總精子數以精液濃度 \times 精液量估算。

III. 流式細胞儀分析精液性狀

(i) 精液濃度調整

原精液以緩衝稀釋液 (EasyBuffer A, IMV, L'Aigle, France) 稀釋，將受檢精液濃度調整為 3.5×10^7 sperm/mL，以供流式細胞儀 (GUAVA Easyocyte HT System, Guava Technologies, IMV Technologies, L'Aigle, France) 分析使用。

(ii) 精液品質分析

精液品質分析參照郭 (2013) 方法進行，項目包括精子存活率 (viability)、頭帽及精子膜完整性 (acrosome & sperm membrane integrity)、粒線體膜電位 (mitochondrial membrane potential)、精子染色質結構 (sperm chromatin structure) 等精子細微結構狀態分析。

1. 精子存活率分析

配製 SYBR 14 working solution 為 1 μ L 之 SYBR 14 (1 mM) + 49 μ L 之 easy buffer，mix solution A 為 1 μ L 之 SYBR 14 working solution + 1 μ L 之碘化丙啶 (propidium iodide, PI) + 48 μ L 之 easy buffer 備用。取 3 μ L 濃度為 3.5×10^7 sperm/mL 之稀釋精液加上 147 μ L easy buffer 及 50 μ L mix solution A 混合後，於 37°C 避光培養 10 分鐘後以流式細胞儀進行分析，SYBR 14 標記細胞膜正常之存活精子，PI 則標記細胞膜受損之死亡精子，以此判定存活率。

2. 頭帽及精子膜完整性分析

配製 mix solution B 為 1 μ L 之 PI + 0.5 μ L 之 PNA-FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 48.5 μ L 之 easy buffer 備用。取 4 μ L 濃度為 3.5×10^7 sperm/mL 之稀釋精液加上 146 μ L easy buffer 及 50 μ L 之 mix solution B 混合後，於 37°C 避光培養 10 分鐘後以流式細胞儀進行分析，PNA-FITC 標記頭帽完整精子，PI 則標記細胞膜受損之死亡精子，以此判定頭帽及精子膜完整性。

3. 粒線體膜電位分析

配製 mix solution C 為 2 μ L 之 Guava JC-1 + 48 μ L 之 easy buffer 備用。取 3 μ L 濃度為 3.5×10^7 sperm/mL 之稀釋精液加上 147 μ L easy buffer 及 50 μ L mix solution C 混合後，於 37°C 避光培養 30 分鐘後以流式細胞儀進行分析，以 JC-1 進行標記，粒線體為去極化狀態 (depolarization) 則 JC-1 為單體形式，呈現綠色螢光，若粒線體為極化狀態 (polarization) 則 JC-1 聚集，呈現橙色螢光，以此判定粒線體膜電位。

4. 精子染色質結構分析

配製 AO (acridine orange, AO) staining solution 為 10 μ L 之 AO solution + 9.99 mL 之 staining solution (6 μ g/

mL acridine orange, 100 mmol/L citric acid, 200 mmol/L Na_2HPO_4 , 1 mmol/L disodium EDTA and 0.15 mol/L NaCl; pH 6.0) 備用。取 5 μL 濃度為 3.5×10^7 sperm/mL 之稀釋精液加入 200 μL 之 TNE buffer (0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl and 1 mM disodium EDTA; pH 7.4) 後，加入 0.4 mL acid detergent (0.1% Triton X-100, 0.15 mol/L NaCl and 0.08 mol/L HCl; pH 1.2)，等待 30 秒後再加入 1.2 mL 之 AO staining solution，室溫培養 3 分鐘後以流式細胞儀進行分析，AO 能分別與結構完整之雙股 DNA 及片斷化之 DNA 產生出不同螢光，以此判定染色質結構完整性。

IV. 精液性狀相關性分析

各項精液性狀間相關性以 SAS 套裝軟體 (SAS, 2013) 之皮爾森相關 (Pearson correlation) 進行分析，相關係數 r 數值介於 -1 到 1 間，以 $0 < r < 0.3$ 為低度正相關， $0.3 < r < 0.7$ 為中度正相關， $0.7 < r < 1$ 為高度正相關， $-0.30 < r < 0$ 為低度負相關， $-0.7 < r < -0.3$ 為中度負相關， $-1 < r < -0.7$ 為高度負相關。

V. 統計分析

本試驗所收集之精液性狀統計以平均值 \pm 標準偏差 (mean \pm standard deviation) 表示。試驗所得之各項數值，使用 SAS 套裝軟體 (SAS, 2013) 以一般線性模式程序 (general linear model procedure, GLM) 進行統計分析，分別評估品種、採精日齡及季節等效應對精液性狀之影響，並以 tukey 檢定比較差異的顯著性。

結果與討論

I. 品種對精液性狀之影響

試驗收集 357 頭杜洛克及 84 頭藍瑞斯共 441 頭種公豬精液進行精液性狀分析，結果如表 1 所示。杜洛克公豬精液量平均為 187.49 ± 37.61 mL、活力平均為 $92.81 \pm 2.24\%$ 、精液濃度平均為 $0.40 \pm 0.10 \times 10^9$ sperm/mL、總精子數平均為 $74.40 \pm 20.81 \times 10^9$ sperm/ejaculation，精子存活率平均為 $79.68 \pm 14.52\%$ 、頭帽及精子膜完整率平均為 $65.79 \pm 13.71\%$ 、精子粒線體去極化比例平均為 $29.88 \pm 16.83\%$ ，平均精子染色質結構完整比例平均為 $91.31 \pm 10.77\%$ ；藍瑞斯精液量平均為 207.87 ± 41.66 mL、活力平均為 $93.06 \pm 2.12\%$ 、精液濃度平均為 $0.35 \pm 0.09 \times 10^9$ sperm/mL、總精子數平均為 $72.15 \pm 19.76 \times 10^9$ sperm/ejaculation、精子存活率平均為 $80.96 \pm 12.89\%$ 、頭帽及精子膜完整率平均為 $66.44 \pm 14.33\%$ 、精子粒線體去極化比例平均為 $29.51 \pm 17.97\%$ ，精子染色質結構完整比例平均為 $92.73 \pm 7.63\%$ 。在比較杜洛克與藍瑞斯兩品種差異上，杜洛克公豬精液量顯著低於藍瑞斯公豬 ($P < 0.05$)，但其精液濃度則顯著高於藍瑞斯公豬 ($P < 0.05$)，Kennedy and Wilkins (1984) 研究顯示公豬的精液量、精液濃度、存活精子百分比、精子活動力等精液性狀受品種影響，而在 Smital (2009) 研究中，其檢測杜洛克與藍瑞斯公豬之精液量分別為 185.1 mL 與 264.7 mL，精液濃度分別為 0.50×10^9 sperm/mL 與 0.43×10^9 sperm/mL，亦發現品種會影響精液量與精液濃度，另在 Schulze *et al.* (2014) 研究亦指出杜洛克公豬精液量較藍瑞斯公豬低，但其精液濃度較藍瑞斯公豬高。因試驗樣品採集自參加種豬拍賣之種公豬，在參加拍賣前精子活力不佳或無法採精的個體已被汰除，因此所分析的樣品在傳統精子活力項目有極佳的表現。Schulze *et al.* (2014) 分析德國 AI 站公豬的精液性能，其杜洛克品種公豬精液量平均為 147.1 mL，較本試驗杜洛克豬群低，但其精液濃度平均為 0.433×10^9 sperm/mL，則較本試驗杜洛克豬群稍高。張 (2008) 評估 4 間人工授精站豬隻精液共 36 個樣品，稀釋後 1 日之精子存活率平均為 75.7%，稀釋後 3 日之精子存活率平均為 61.5%，而於商業豬場 AI 公豬新鮮精液則有 88.0% 之存活率。本試驗因收集各地種豬場樣品，傳統鏡檢項目能於現場以新鮮精液進行外，採集之樣品需攜回實驗室以流式細胞儀進行分析，並儘可能於採精後 1 日內完成分析，以流式細胞儀分析之精子存活率結果略高於張 (2008) AI 站稀釋 1 日所測之結果，顯示種豬協會拍賣之種公豬具良好之精液品質。

II. 採精日齡對精液性狀之影響

公豬的性成熟發生年齡受品種、環境和社會因素影響 (Kunavongkrit *et al.*, 2005, Huang *et al.*, 2010, Yeste *et al.*, 2010, Kumaresan *et al.*, 2011)。Reiland (1978) 與 Schinckel *et al.* (1983) 的研究指出藍瑞斯及約克夏約於 5 – 6 月齡性腺逐漸成熟並開始發身，一般達 7 – 8 月齡時公豬之精液已具有受精能力，因此，在商用公豬飼養管理上常於達 7 月齡後進行採精訓練。臺灣區種豬產業協會種公豬體型比賽之參賽豬隻主要為 240 – 299 日齡之年輕公豬，拍賣會則包含少數 300 – 350 日齡與 350 日齡以上之公豬，將試驗樣品依採精時之公豬日齡進行比較，分為 240 – 269 日齡、270 – 299 日齡及 300 日齡以上 3 組，杜洛克公豬試驗結果如表 2 所示，種豬產業協會拍賣之杜洛克公豬精子皆具有良好的品質，240 – 269 日齡公豬精子存活率平均達 $77.75 \pm 14.02\%$ ，超過 300 日齡的精選及特選公豬，精子存活率平均更達 $89.58 \pm 6.41\%$ ，而在精液量、總精子數、精子存活率、頭帽及精

子膜完整性等性狀比較上，300 日齡以公豬顯著高於 270 – 299 日齡與 240 – 269 日齡公豬 ($P < 0.05$)；而粒線體去極化比例則是 300 日齡以上公豬顯著低於 270 – 299 日齡與 240 – 269 日齡公豬 ($P < 0.05$)。綜上結果顯示 270 – 299 日齡與 240 – 269 日齡精液性狀表現相近，300 日齡以上杜洛克公豬則有較佳的產精能力，推測係因年齡增長，睪丸及其附屬性腺發育更趨完整，故其產精能力較年輕公豬更加穩定良好 (Huang *et al.*, 2010)。Pinart and Puigmulé (2013) 也認為 9 月齡公豬精液性狀會隨著性腺的持續生長及發育而逐步提升。

表 1. 品種對拍賣公豬精液性狀之影響

Table 1. Effect of breed on semen quality traits of auctioned boars

Traits	Duroc	Landrace
No. of auctioned boars	357	84
Volume (mL)	187.49 ± 37.61 ^b	207.87 ± 41.66 ^a
Motility (%)	92.81 ± 2.24	93.06 ± 2.12
Concentration (10 ⁹ sperm / mL)	0.40 ± 0.10 ^a	0.35 ± 0.09 ^b
Total sperm number (10 ⁹ sperm / ejaculation)	74.40 ± 20.81	72.15 ± 19.76
Viability (%) [#]	79.68 ± 14.52	80.96 ± 12.89
Acrosome and sperm membrane integrity (%)	65.79 ± 13.71	66.44 ± 14.33
Mitochondrial depolarization (%) [*]	29.88 ± 16.83	29.51 ± 17.97
Chromatin structure integrity (%)	91.31 ± 10.77	92.73 ± 7.63

^{a, b} Means within the same row without the same superscripts differ ($P < 0.05$).

[#] n = 355 and 84, respectively.

^{*} n = 338 and 79, respectively.

表 2. 採精日齡對杜洛克公豬精液性狀之影響

Table 2. Effect of the Duroc boars age were collected semen on semen characteristics

Traits	Semen collection age		
	240 – 269 days	270 – 299 days	over 300 days
No. of Duroc boars	82	257	18
Volume (mL)	188.35 ± 35.98 ^b	184.48 ± 35.14 ^b	226.56 ± 55.71 ^a
Motility (%)	92.88 ± 2.08	92.77 ± 2.37	93.00 ± 0.00
Concentration (10 ⁹ sperm / mL)	0.39 ± 0.11	0.40 ± 0.10	0.43 ± 0.06
Total sperm number (10 ⁹ sperm / ejaculation)	73.39 ± 22.60 ^b	73.29 ± 19.71 ^b	94.89 ± 17.76 ^a
Viability (%) [#]	77.75 ± 14.02 ^b	79.60 ± 14.84 ^b	89.58 ± 6.41 ^a
Acrosome and sperm membrane integrity (%)	64.06 ± 14.41 ^b	65.71 ± 13.58 ^b	74.92 ± 7.99 ^a
Mitochondrial depolarization (%) [*]	31.15 ± 19.13 ^a	30.27 ± 16.28 ^a	18.50 ± 6.90 ^b
Chromatin structure integrity (%)	92.37 ± 8.60	90.70 ± 11.65	95.28 ± 2.32

^{a, b} Means within the same row without the same superscripts differ ($P < 0.05$).

[#] n = 82, 255, and 18, respectively.

^{*} n = 78, 243, and 17, respectively.

然而在藍瑞斯精子採精日齡分析上，因 00 日齡以上豬隻僅有 1 頭進行精液分析，故未納入統計分析，採精日齡僅分為 240 – 269 日齡及 270 – 299 日齡 2 組，結果如表 3 所示，其 240 – 269 日齡精液濃度顯著高於 270 – 299 日齡精液濃度 ($P < 0.05$)，Knecht *et al.* (2017) 研究指出波蘭 AI 中心之公豬精液，發現 13 – 18 月齡公豬精液濃度顯著低於 8 – 9 月齡公豬及 10 – 12 月齡，但 13 – 18 月齡公豬精液量顯著高於 8 – 9 月齡及 10 – 12 月齡公豬，若比較總精子數，則以 13 – 18 月齡公豬有較佳的表現，顯示公豬在 18 月齡前，隨年齡增加有較佳總精子數，本研究在藍瑞斯公豬 240 – 269 日齡與 270 – 299 日齡，只有精液濃度有差別，其餘精液

性狀則無顯著差異，可能因 2 組日齡組別間生理發育程度相似，精液性能並無太大之差別，且藍瑞斯公豬採樣分析頭數較少，年齡對藍瑞斯精液性狀之影響後續仍需進一步累積資料進行評估。

表 3. 採精日齡對藍瑞斯公豬精液性狀之影響

Table 3. Effect of the Landrace boars age were collected semen on semen characteristics

Traits	Semen collection age	
	240 – 269 days	270 – 299 days
No. of Duroc boars	20	64
Volume (mL)	203.70 ± 40.08	209.17 ± 42.36
Motility (%)	93.25 ± 2.55	93.00 ± 1.99
Concentration (10 ⁹ sperm / mL)	0.39 ± 0.08 ^a	0.34 ± 0.08 ^b
Total sperm number (10 ⁹ sperm / ejaculation)	78.25 ± 16.83	70.25 ± 20.34
Viability (%)	83.67 ± 8.68	80.11 ± 13.89
Acrosome and sperm membrane integrity (%)	68.99 ± 12.13	65.65 ± 14.95
Mitochondrial depolarization (%) [*]	31.04 ± 19.28	29.09 ± 17.74
Chromatin structure integrity (%)	95.07 ± 3.09	92.00 ± 8.46

^{a, b} Means within the same row without the same superscripts differ ($P < 0.05$).

^{*} n = 17 and 62, respectively.

III. 採精季節對精液性狀之影響

公豬精液品質受季節效應影響已有多篇文獻論述 (Huang *et al.*, 2000; Peña *et al.*, 2019; Rungruangsak *et al.*, 2021)，臺灣位處熱帶及亞熱帶地區，夏季高溫多濕造成豬隻熱緊迫，影響豬隻的生產力。熱緊迫會造成母豬繁殖性能下降 (Paterson *et al.*, 1978; Lucy and Safranski, 2017)，對公豬生殖力亦有負面影響如精液量減少 (Cameron and Blackshaw, 1980)、精液濃度降低 (Egbunike and Dede, 1980)、活力降低且形態異常率增加 (Egbunike and Dede, 1980; Barranco *et al.*, 2013) 及性慾降低 (Flowers, 1997) 等。精液分析結果依採精月份以季節進行分類，3 – 5 月為春季、6 – 8 月為夏季、9 – 11 月為秋季、12 – 2 月為冬季，並評估採精季節對精液性狀之影響，結果如表 5、6 所示。杜洛克公豬精液濃度春季及冬季顯著高於夏季及秋季 ($P < 0.05$)，總精子數春季及冬季顯著高於秋季 ($P < 0.05$)，與春季及冬季相比，在溫度較高的夏季及接續的秋季，對杜洛克公豬精液有負面影響。另在流式細胞儀分析性狀方面，精子細胞粒線體去極化比例越高即表示精液品質越不好，秋季精子粒線體去極化比例顯著高於春季 ($P < 0.05$)，顯示秋季精液品質較春季差。精子染色質結構完整比例以秋季最差，顯著低於其他季節 ($P < 0.05$)，Peña *et al.* (2017) 指出熱緊迫誘導精子 DNA 損傷產生，DNA 損傷的精子可能是造成母豬懷孕損失增加及產仔數降低的原因，Didion *et al.* (2009) 認為精子 DNA 片斷化若大於 6%，會造成分娩率及產仔數減少。本試驗在杜洛克公豬精液量、精子活力、精子存活率、頭帽及精子膜完整性等性狀上，季節間則無顯著差異。藍瑞斯公豬精液濃度則以春季顯著高於夏季及秋季 ($P < 0.05$)，精子染色質結構完整比例秋季顯著低於冬季 ($P < 0.05$)，其他性狀於各季節間則無顯著差異。Peña *et al.* (2019) 研究認為精子 DNA 完整性能作為區分夏季期間精子品質的指標，本研究結果顯示季節影響杜洛克及藍瑞斯公豬的精液性狀，溫度較高的夏季及接續的秋季對豬隻精液濃度及精子染色質結構完整性有負面影響，相關性狀可做為未來於選育公豬耐熱性能時評估指標之選擇。

IV. 精液性狀相關性

本試驗研究，精液濃度與精液量相關係數為 -0.23，呈低度負相關與 Ciereszko *et al.* (2000) 的報告有相似的結果，而 Knecht *et al.* (2014) 研究亦發現，豬隻之精液濃度與精液量呈中度負相關性，相關係數介於 -0.55 至 -0.66 之間。精液濃度與總精子數相關性上，Kozdrowski and Dubiel (2004) 在野豬的研究中發現，兩者呈現高度的相關性，相關係數為 0.77，在本試驗研究，兩者相關係數為 0.73，亦呈現高度相關。在相關分析上，傳統精液檢測精液量、精子活力、精液濃度及總精子數等 4 項性狀，與應用流式細胞儀進行精子存活率、頭帽及精子膜完整率、精子粒線體去極化率及精子染色質結構完整率等 4 項性狀，傳統 4 項性狀中，除精子活力與精子染色質結構完整率具有中度相關性 ($r = 0.39$) 之外，傳統性狀與流式細胞儀檢測性狀多呈低度相關；而在流式細胞

儀 4 項檢測性狀中，精子存活率與頭帽及精子膜完整率呈高度正相關 ($r = 0.84$)，與精子粒線體去極化率呈高度負相關 ($r = -0.79$)，與精子染色質結構完整率呈中度正相關 ($r = 0.66$)，顯示流式細胞儀 4 項精液性狀間相關性較高。應用流式細胞儀檢測精液品質，能於短時間內對上千個粒子進行分析，相較於早期檢測精子死活或其結構損傷須採用人工計算數量，能大幅提升分析速度與準確度，且流式細胞儀檢測能提供精液樣品如頭帽及精子膜、粒線體電位及染色質結構等更細微狀態的資訊，因此，將能對精液品質作更深入的評估，並提供種豬繁殖與選育之應用參考。

表 4. 採精季節對杜洛克公豬精液性狀之影響

Table 4. Effect of season on semen quality traits of Duroc boars

Traits	Spring	Summer	Autumn	Winter
No. of Duroc boars	121	61	80	95
Volume (mL)	190.63 ± 37.41	193.80 ± 40.55	180.09 ± 39.95	185.68 ± 33.03
Motility (%)	92.99 ± 1.71	92.21 ± 3.57	92.75 ± 2.09	93.00 ± 1.79
Concentration (10^9 sperm / mL)	0.42 ± 0.09 ^a	0.37 ± 0.11 ^b	0.36 ± 0.10 ^b	0.43 ± 0.09 ^a
Total sperm number (10^9 sperm / ejaculation)	79.16 ± 17.89 ^a	71.19 ± 23.39 ^{ab}	64.12 ± 21.62 ^b	79.06 ± 18.48 ^a
Viability (%) [#]	81.03 ± 12.85	77.31 ± 16.81	77.36 ± 17.67	81.46 ± 11.42
Acrosome and sperm membrane integrity (%)	66.29 ± 12.30	65.59 ± 14.48	63.83 ± 16.57	66.94 ± 12.20
Mitochondrial depolarization (%) [*]	26.93 ± 13.80 ^b	28.75 ± 15.99 ^{ab}	33.36 ± 19.91 ^a	31.84 ± 17.71 ^{ab}
Chromatin structure integrity (%)	93.60 ± 7.47 ^{ab}	90.10 ± 13.66 ^b	84.95 ± 14.95 ^c	94.53 ± 2.87 ^a

^{a, b, c} Means within the same row without the same superscripts differ ($P < 0.05$).

[#] n = 119, 61, 80, and 95, respectively.

^{*} n = 121, 61, 80, and 76, respectively.

表 5. 採精季節對公豬精藍瑞斯液性狀之影響

Table 5. Effect of season on semen quality traits of Landrace boars

Traits	Spring	Summer	Autumn	Winter
No. of Duroc boars	24	15	24	21
Volume (mL)	203.38 ± 39.62	210.80 ± 53.51	211.92 ± 38.84	206.29 ± 40.06
Motility (%)	93.21 ± 2.32	92.33 ± 2.58	93.42 ± 2.04	93.00 ± 1.58
Concentration (10^9 sperm / mL)	0.40 ± 0.07 ^a	0.31 ± 0.10 ^b	0.33 ± 0.09 ^b	0.35 ± 0.06 ^{ab}
Total sperm number (10^9 sperm / ejaculation)	80.61 ± 15.34	64.23 ± 21.76	68.47 ± 23.16	72.36 ± 15.90
Viability (%)	79.28 ± 14.22	76.90 ± 15.48	83.75 ± 11.91	82.57 ± 9.91
Acrosome and sperm membrane integrity (%)	66.03 ± 16.21	66.01 ± 14.60	69.16 ± 14.80	64.12 ± 11.59
Mitochondrial depolarization (%) [*]	28.91 ± 17.83	30.28 ± 13.13	26.67 ± 17.89	33.93 ± 22.49
Chromatin structure integrity (%)	93.75 ± 4.51 ^{ab}	92.29 ± 6.07 ^{ab}	89.40 ± 11.88 ^b	95.67 ± 2.54 ^a

^{a, b} Means within the same row without the same superscripts differ ($P < 0.05$).

^{*} n = 24, 15, 24, and 16, respectively.

結 論

參加台灣區種豬產業協會種豬拍賣的種公豬具有良好的精液品質，比較杜洛克與藍瑞斯公豬共 8 項精液性狀，精液量與精液濃度在品種間有差異；在採精日齡影響上，顯示 300 日齡以上杜洛克公豬則有較年輕公豬佳的產精能力，藍瑞斯公豬則待更多資料累積再進行進一步分析；而在季節影響上，顯示季節影響杜洛克及藍瑞斯公豬的精液性狀，其中夏季及秋季所採集精子之多項精液品質均較冬春季者差，顯示該等季節之畜舍環境及公豬飼養管理仍有改善之空間；另在鏡檢性狀與流式細胞儀檢測結果相關性上，鏡檢性狀與流式細胞儀檢測性狀呈低度相關，而流式

表 6. 拍賣公豬精液性狀相關性
Table 6. Correlation between semen quality traits of auctioned boars

	Volume	Motility	Concentration	Total sperm number	Viability	Acrosome and sperm membrane integrity	Mitochondrial depolarization	Chromatin structure integrity
Volume	1							
Motility	-0.01	1						
Concentration	-0.23**	0.42**	1					
Total sperm number	0.47**	0.36**	0.73**	1				
Viability	0.02	0.28**	0.17**	0.16**	1			
Acrosome and sperm membrane integrity	-0.01	0.19**	0.17**	0.14**	0.84**	1		
Mitochondrial depolarization	0.02	-0.24**	-0.18**	-0.14**	-0.79**	-0.81**	1	
Chromatin structure integrity	0.10*	0.39**	0.26**	0.28**	0.66**	0.53**	-0.56**	1

* P < 0.05.

** P < 0.01.

細胞儀之精子存活率、頭帽及精子膜完整性、粒線體膜電位及精子染色質結構等性狀間相關性高；綜上資訊可提供未來於評估種畜禽繁殖與選育應用，另外，該新穎精子品質參數與公豬生育力及母豬生產力之關聯性，則尚待進一步評估，以確認精液品質新穎參數佳之公豬是否有同樣具有較佳的生育效率，則有待進一步的試驗作為驗證。

致 謝

本研究承農業部 103 農科 -2.1.5- 畜 -L2(3) 及 104 農科 -2.5.2- 畜 -L1(7) 經費支持及台灣區種豬產業協會及其會員場協助公豬採精始克完成，謹致謝忱。

參考文獻

- 黃呈耀。1995。豬隻人工受精。臺糖公司畜產研究所養豬技術專輯二版，pp. 28-31。
- 張育京。2008。人工授精站公豬精液品質與生育力之評估。碩士論文。國立宜蘭大學。宜蘭縣。
- 郭廷雍。2013。種畜禽研究團隊－種豬與雞精子品質之檢測及應用。行政院農業委員會畜產試驗所 102 年度科技計畫研究報告。
- Barranco, I., M. D. Ortega, M. J. Martinez-Alborcia, J. M. Vazquez, E. A. Martinez, and J. Roca. 2013. Season of ejaculate collection influences the freezability of boar spermatozoa. *Cryobiology* 67(3): 299-304.
- Boe-Hansen, G. B. and N. Satake. 2019. An update on boar semen assessments by flow cytometry and CASA. *Theriogenology* 137: 93-103.
- Cameron, R. and A. Blackshaw. 1980. The effect of elevated ambient temperature on spermatogenesis in the boar. *Reproduction* 59(1): 173-179.
- Celeghini, E. C., R. P. de Arruda, A. F. de Andrade, J. Nascimento, and C. F. Raphael. 2007. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod. Domest. Anim.* 42(5): 479-488.
- Christensen, P., D. Boelling, K. M. Pedersen, I. R. Korsgaard, and J. Jensen. 2005. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. *J. Androl.* 26(1): 98-106.
- Ciereszko, A., J. S. Ottobre, and J. Glogowski. 2000. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. *Anim. Reprod. Sci.* 64(1-2): 89-96.
- de Andrade, A. F., R. P. de Arruda, E. C. Celeghini, J. Nascimento, S. M. Martins, C. F. Raphael, and A. S. Moretti. 2007. Fluorescent stain method for the simultaneous determination of mitochondrial potential and integrity of plasma and acrosomal membranes in boar sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 42(2): 190-194.
- Didion, B. A., K. M. Kasperson, R. L. Wixon, and D. P. Evenson. 2009. Boar fertility and sperm chromatin structure status: a retrospective report. *J. Androl.* 30(6): 655-660.
- Egbunike, G., and T. Dede. 1980. The influence of short-term exposure to tropical sunlight on boar seminal characteristics. *Int. J. Biometeorol.* 24: 129-135.
- Flowers, W. L. 1997. Management of boars for efficient semen production. *J. Reprod. Fertil.* 52: 67-78. (Suppl.)
- Garner, D. L., L. A. Johnson, S. T. Yue, B. L. Roth, and R. P. Haugland. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.* 15(6): 620-629.
- Heape, W. 1897. The artificial insemination of mammals and subsequent possible fertilisation or impregnation of their ova. *Proceedings of the Royal Society of London, UK.* 61(369-377): 52-63.
- Huang, S., Y. Kuo, Y. Lee, H. Tsou, E. Lin, C. Ju, and W. Lee. 2000. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Anim. Reprod. Sci.* 63(3-4): 231-240.
- Huang, Y. H., L. L. Lo, S. H. Liu, and T. S. Yang. 2010. Age-related changes in semen quality characteristics and expectations of reproductive longevity in Duroc boars. *Anim. Sci. J.* 81(4): 432-437.
- Kennedy, B. and J. Wilkins. 1984. Boar, breed and environmental factors influencing semen characteristics of boars used in artificial insemination. *Can. J. Anim. Sci.* 64(4): 833-843.
- Knecht, D., A. Jankowska-Mąkosa, and K. Duziński. 2017. The effect of age, interval collection and season on selected semen parameters and prediction of AI boars productivity. *Livest. Sci.* 201: 13-21.

- Knecht, D., S. Środoń, and K. Duziński. 2014. The influence of boar breed and season on semen parameters. *South Afr. J. Anim. Sci.* 44: 1-9.
- Kozdrowski, R. and A. Dubiel. 2004. The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa* L.) semen. *Anim. Reprod. Sci.* 80: 281-289.
- Kumaresan, A., K. M. Bujarbaruah, G. Kadirvel, G. Khargharia, R. G. Sarma, J. Goswami, R. Basumatary, K. Palaniappan, and R. K. Bardoloi. 2011. Early sexual maturity in local boars of Northeastern India: age-related changes in testicular growth, epididymal sperm characteristics and peripheral testosterone levels. *Theriogenology* 75: 687-695.
- Kunavongkrit, A., A. Suriyasomboon, N. Lundeheim, T. W. Heard, and S. Einarsson. 2005. Management and sperm production of boars under differing environmental conditions. *Theriogenology* 63: 657-667.
- Lucy, M. C. and T. J. Safranski. 2017. Heat stress in pregnant sows: thermal responses and subsequent performance of sows and their offspring. *Mol. Reprod. Dev.* 84: 946-956.
- Paterson, A., I. Barker, and D. Lindsay. 1978. Summer infertility in pigs: its incidence and characteristics in an Australian commercial piggery. *Aust. J. Exp. Agr.* 18: 698-701.
- Peña, S. T., Jr., B. Gummow, A. J. Parker, and D. B. Paris. 2017. Revisiting summer infertility in the pig: could heat stress-induced sperm DNA damage negatively affect early embryo development? *Anim. Prod. Sci.* 57: 1975-1983.
- Peña, S. T., Jr., F. Stone, B. Gummow, A. J. Parker, and D. Paris. 2019. Tropical summer induces DNA fragmentation in boar spermatozoa: implications for evaluating seasonal infertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 31: 590-601.
- Pinart, E. and M. Puigmulé. 2013. Factors affecting boar reproduction, testis function, and sperm quality. In: S. Bonet, I. Casas, W. V. Holt, and M. Yeste, editors, *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 109-202.
- Purvis, K., H. Rui, A. Schølberg, S. Hesla, and O. P. Clausen. 1990. Application of flow cytometry to studies on the human acrosome. *J. Androl.* 11: 361-366.
- Reiland, S. 1978. Growth and skeletal development of the pig. *Acta Radiol. Suppl.* 358: 15-22.
- Rungruangsak, J., S. Sangkaphet, K. Buranaamnuy, P. Pongpeng, and P. Tummaruk. 2021. Boar sperm production in a tropical environment. *Thai. J. Vet. Med.* 51: 213-220.
- SAS. 2013. *STAT User's Guide: Version 9.4 ed.* SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schinckel, A., R. Johnson, R. Pumfrey, and D. R. Zimmerman. 1983. Testicular growth in boars of different genetic lines and its relationship to reproductive performance. *J. Anim. Sci.* 56: 1065-1076.
- Schulze, M., S. Buder, K. Rüdiger, M. Beyerbach, and D. Waberski. 2014. Influences on semen traits used for selection of young AI boars. *Anim. Reprod. Sci.* 148: 164-170.
- Smital, J. 2009. Effects influencing boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 335-346.
- Tao, J., E. S. Critser, and J. K. Critser. 1993. Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. *Mol. Reprod. Dev.* 36: 183-194.
- Yeste, M., S. Sancho, M. Briz, E. Pinart, E. Bussalleu, and S. Bonet. 2010. A diet supplemented with L-carnitine improves the sperm quality of Piétrain but not of Duroc and Large White boars when photoperiod and temperature increase. *Theriogenology* 73: 577-586.

Application of flow cytometry to evaluate semen quality traits of auctioned boars ⁽¹⁾

Lin-Liang Peng ⁽²⁾ Hsiu-Lien Lin ⁽²⁾ Yung-Yu Lai ⁽²⁾ Der-Yuh Lin ⁽²⁾ Jenn-Rong Yang ⁽²⁾
Shun-Kuei Hsu ⁽³⁾ Kuei-Juh Liu ⁽³⁾ and Ting-Yung Kou ⁽²⁾⁽⁴⁾

Received: Mar. 11, 2024; Accepted: May 31, 2024

Abstract

Semen quality directly affects in the breeding traits such as sow's conception rate or litter size. Boar's semen quality can detect and predict the fertility level of boars and is a key measure in maintaining productive efficiency and avoiding economic losses. This study used flow cytometry to evaluate the semen of Duroc and Landrace boars participating in the Formosan Farmers Association for Swine Improvement auction. The effect of breeds, days of age of semen collection and season on semen traits were analyzed for application and selection of breeding pigs with excellent sperm production ability. The results showed that the Landrace boars had higher semen volume but the semen concentration, compared with that of Landrace boars, was lower ($P < 0.05$). Regarding the influence of days of age at semen collection, traits such as the semen volume, total sperm counts, sperm viability, and acrosome and sperm membrane integrity of Duroc boars at aged over 300 days were significantly higher than those at age 240 - 269 days and 270 - 299 days ($P < 0.05$), indicating that Duroc boars over 300 days old have better semen traits, compared with those boars at younger age. While the effect of days of age on Landrace boars requires more data for further analysis. In terms of seasonal effects, the results showed that the chromatin structural integrity is lower in autumn for semen collected from the semen traits of Duroc and Landrace boars. In sum, the research results can be used for future evaluation of breeding and selection in breeding pigs.

Key words: Semen quality traits, Flow cytometry, Auctioned boars, Boars age, Semen collection season.

(1) Contribution No. 2793 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Genetics and Physiology Division, MOA-TLRI, HsinHua Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

(3) Formosan Farmers Association for Swine Improvement.

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