

多指标正交设计评价和 优化巴马香猪精液冷冻稀释液^①

孔德营¹, 商海涛², 刘福慧³,
韩 勇¹, 魏 泓², 张家骅⁴

1. 遵义医学院 基础医学院 生理学教研室, 贵州 遵义, 563000;
2. 第三军医大学 基础部 实验动物学教研室, 重庆 400038;
3. 遵义医学院 附属医院 输血科, 贵州 遵义 563000;
4. 西南大学 动物科技学院, 重庆市草食动物资源保护与利用工程技术研究中心, 重庆 400716

摘要: 该文通过多指标正交实验设计对巴马香猪精液冷冻稀释液中低密度脂蛋白(LDL, 因素 A)、海藻糖(因素 B)和甘油(因素 C)等 3 种保护剂联合使用时的作用进行评价, 并分别对 3 种物质的最佳体积质量分数、摩尔浓度和体积百分比进行优化。结果表明 3 种保护剂对精子活率(TMS)、质膜完整性(PMI)和彗星率(CR)作用的主次顺序均为 A>C>B, 对精子顶体完整性(AD)作用的主次顺序为 B>A>C; 3 种保护剂对 TMS 和 PMI 均有极显著的保护作用($p<0.01$), 对 CR 均无显著性作用($p>0.05$); LDL 和海藻糖对 AI 有显著的保护作用($p<0.05$), 甘油对 AI 无显性作用($p>0.05$); 通过因素与指标关系趋势图的绘制, 发现由各个指标得到的最佳组合均为 A₂B₃C₂, 且指标间的相关性均达到了显著水平($p<0.05$)。因此, 用 TMS, PMI, AI 和 CR 评价巴马香猪冷冻—解冻后精液质量时, 指标间不存在矛盾, 用 9%(w/v)低密度脂蛋白、200 mmol/L 海藻糖和 2%甘油为巴马香猪精液冷冻稀释液中最优组合。

关键词: 巴马香猪; 精液冷冻; 多指标正交试验设计; 低密度脂蛋白; 甘油; 海藻糖

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)7-0001-07

精液冷冻保存可充分发挥优良种公畜的遗传潜力, 便于长途运输, 加快畜群品种改良步伐, 同时该方法也是建立动物精子库不可缺少的手段^[1-2]。目前, 牛^[3]和 小鼠^[4]的精液冷冻技术较为成熟, 已经具有商业化精子库, 而猪精液冷冻保存的效果仍不理想^[5]。与鲜精相比, 冷冻—解冻后的猪精子活率和顶体完整性较低, 而且猪冻精的产子率以及窝产仔猪数都大大低于鲜精^[6]。精液冷冻过程中, 冰晶首先在细胞外液中形成, 此时冰晶与溶质分离, 未冻结部分电解质溶液的浓度升高, 导致细胞脱水, 并进一步引起细胞变性及细胞膜结构的损伤, 即渗透性损伤^[7-8]。因此, 精液冷冻过程中, 要尽可能地避免细胞内外高渗溶液的形成, 并以此减少细胞膜的损伤, 尤其是脂蛋白复合物的损伤^[9]。研究发现, 低密度脂蛋白(LDL)、海藻糖

① 收稿日期: 2014-01-23

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)重大科学问题导向项目资助(2011CBA01006); 遵义医学院重点学科建设项目资助(XZXK-20120702); 2013 年重庆高校创新团队建设计划项目资助。

作者简介: 孔德营(1979-), 男, 河北遵化人, 博士, 讲师, 主要从事生殖生理学研究。

通信作者: 张家骅, 教授, 博士生导师。

和甘油在精液冷冻过程中具有较好的保护作用^[7, 10-11]。但是这 3 种保护剂同时使用对冷冻过程中猪精子的保护作用及其组合时的最佳体积质量分数、摩尔浓度及体积百分比还未见报道。

本文采用多指标正交实验设计, 利用计算机辅助分析系统(CASA)、低渗肿胀(HOST)实验、考马斯亮蓝染色和中性彗星实验分别评估不同实验条件对冷冻—解冻后精子活率(TMS)、质膜完整性(PMI)、顶体完整性(AI)以及 DNA 完整性(彗星率, CR)的影响, 分析冷冻稀释液中的 LDL、海藻糖与甘油的不同体积质量分数、摩尔浓度及体积百分比对冷冻解冻后巴马香猪精液品质的影响, 并对各指标间的相关性和回归性进行统计分析, 以评价精液冷冻稀释液中低密度脂蛋白、甘油和海藻糖联用时对精子的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

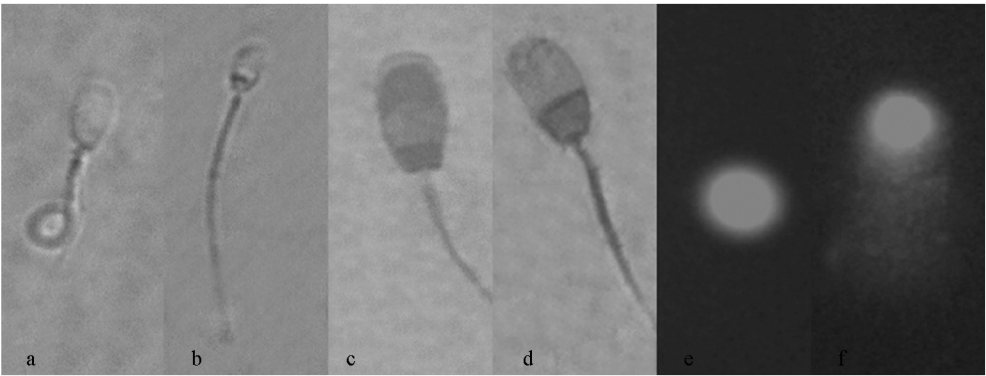
伟力精子质量检测系统(WLJY-9000 型, 北京伟力新世纪发展有限公司)、超低温温度计(600-1010K 型, 美国 Barnant 公司)、自动高速离心机(Heraeus, 德国)、荧光显微镜(Nikon E600, 日本); 试剂除甘油(中国国药上海化学试剂有限公司)外, 葡萄糖、海藻糖及 Tris 等均购自 SIGMA 公司。

1.2 精液冷冻与解冻

选择 8 头 1~2 岁健康成年巴马公猪, 采用人工手握采精法^[9], 采精频率为每周 1 次。收集射出精液中段浓稠部分(活率 >0.7), 保温瓶预热至 32 ℃, 30 min 内送到实验室。LDL 参考 Moussa 等^[12]的方法在鸡蛋卵黄中提取。用电子天平准确称量各种试剂, 配制成洗液(每 100 mL 含葡萄糖 5.75 g、乳糖 0.25 g、柠檬酸钠 0.45 g、EDTA 0.35 g、碳酸氢钠 0.12 g、氯化钾 0.04 g、青霉素 7.5 mg、链霉素 5 mg、GSH 0.03 g)与稀释液 I 液(每 100 mL 含葡萄糖 4.0 g、TES 1.5 g、Tris 0.25 g、GSH 38.5 mg、青霉素 9.5 mg、链霉素 6.3 mg)。采精前, 根据实验设计, 将稀释液 I 与不同体积质量分数(w/v)的 LDL、不同摩尔浓度的海藻糖配制成稀释液 II 液。稀释液 II 液配制完成后, 加入不同体积百分比的甘油即为冷冻液。解冻液每 100 mL 含葡萄糖 0.37 g、柠檬酸钠 0.06 g、碳酸氢钠 0.012 5 g、EDTA 0.012 5 g、氯化钾 0.007 5 g。将精液和预热至 32 ℃的洗液各 25 mL 沿管壁倒入 50 mL 离心管, 轻轻混匀, 用 6~8 层纱布包裹离心管, 置于 15 ℃平衡 3 h。500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 沉淀中加入预热至 15 ℃的稀释液 II, 使精子悬液体积达到 1 mL, 并于 1.5 h 内降至 4 ℃, 加入 1 mL 预冷至 4 ℃的冷冻液, 混匀, 静置 5~10 min。在 4 ℃的冰箱内, 利用专用注射器将精液迅速吸入已预冷至 4 ℃的 0.25 mL 细管内, 快速密封管口。将冷冻槽浸入液氮中预冷后, 置于距液氮面 3 cm 处。待温度恒定达到始冻温度($-110\sim-125\text{ }^{\circ}\text{C}$)^[10], 将精液细管放入冷冻槽熏蒸 10 min, 最后将细管冻精浸入液氮内保存。解冻时, 将细管置于 45 ℃水浴中 10 s, 用预热至 37 ℃的解冻液稀释 10 倍, 37 ℃孵育 10 min, 待检。

1.3 解冻后精液品质评定

经解冻和孵育后, 取 15 μL 精液, 使用计算机辅助精子分析仪(CASA)分析精子的活率(TMS); 采用低渗肿胀(HOST)实验检测精子质膜完整性^[10], 将解冻后的精液用等温低渗液(7.35 g 柠檬酸钠和 13.51 g 果糖溶于 1 L 蒸馏水中制成)调整密度至 1.0×10^6 个, 37 ℃培养 30 min, 取 10 μL 精液在血小板计数板上, 400 $\times$ 倒置显微镜下观察不同部位的 5 个视野, 计算尾部弯曲的精子百分率, 质膜完整的精子因低渗导致膨胀而表现为尾部弯曲; 采用考马斯亮蓝染色法检测精子顶体完整性^[13], 精子涂片用 0.05% 考马斯亮蓝(G250)染色, 于 1000 $\times$ 普通光学显微镜观察, 顶体完整的精子顶体部分蓝染, 顶体不完整的精子顶体不染色, 每片计数 200 个以上的精子; 采用中性彗星分析(Comet assay)的方法检测解冻后精子 DNA 损伤情况^[9], DNA 未损伤的精子不会形成“彗星”, DNA 损伤的精子形成“彗星”, 经过荧光染色的图片用 Nikon 相机照相, 用彗星分析软件分析所得图片, 用以判定 DNA 损伤程度, 每个样品随机选择 100 个精子。各指标检测结果如图 1 所示。



a. 质膜完整的精子(精子尾部弯曲, 400×); b. 质膜损伤的精子(精子尾部未出现弯曲, 400×); c. 顶体完整的精子(精子顶体蓝染, 且可见完整的顶体缘, 1000×); d. 精子顶体损伤(精子顶体不能染色, 1000×); e. 精子 DNA 完整(未形成彗星, 400×); f. 精子 DNA 损伤(形成彗星, 400×).

图 1 冷冻—解冻后巴马香猪精子的质膜完整性、顶体完整性和 DNA 完整性检测效果图

1.4 冷冻稀释液中不同体积质量分数 LDL、甘油体积百分比和海藻糖摩尔浓度的多指标正交设计

利用正交试验设计技术, 以冷冻—解冻后精子活率、质膜完整性、顶体完整性以及 DNA 损伤程度为评价指标, 对巴马香猪精液冷冻稀释液中的低密度脂蛋白体积质量分数、甘油终体积百分比及海藻糖摩尔浓度等 3 个因素进行研究, 从而优化巴马香猪精液的冷冻稀释液. 各因素水平根据文献报道设计(表 1). $L_9(3^4)$ 多指标正交实验设计方案见表 2, 由于实验只考察 3 种保护剂, 随机选择正交表中第 4 列为空列.

1.5 数据统计分析

数据用平均值表示; 在 $L_p(n^m)$ 正交表中, 实验的 p 个结果分别记为 $y_1, y_2, \dots, y_p$, K_{ij} 为第 j 列因素第 i 水平所对应的实验指标和($i=1, 2, 3; j=1, 2, 3, 4$), $k_{ij} = \overline{K_{ij}}$, $R_j = k_{ij\max} - k_{ij\min}$, R_j 值愈大说明该因素对实验结果的影响愈大, 因素作用的显著性通过方差分析判断; 方差分析中, S_j 是第 j 列的总变差, 当正交表的所有列没被排满因素时, 即有空列时, 所有空列的 S_j 之和就是误差的变差平方和 S_e , 这时 S_e 的自由度 f_e

也为这些空列自由度之和, 其中 $T = \sum_{i=1}^p y_i$, $S_j = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^n K_{ij}^2 - \frac{T^2}{p} (r = \frac{p}{n})$, $F = \frac{\frac{S_j}{f_j}}{\frac{S_e}{f_e}}$; 正交设计方差分析、相关

及回归分析通过 SPSS 18.0 统计软件完成, 方差分析显著性检验采用 Duncan 法, 相关系数显著性检验采用双尾法.

2 结 果

2.1 精液冷冻稀释液中 LDL 体积质量分数、甘油体积百分比和海藻糖摩尔浓度的多指标正交实验设计

分别设 3 个梯度的 LDL 体积质量分数、海藻糖摩尔浓度和甘油体积百分比的保护浓度(表 1), 进行巴马香猪精液冷冻的 $L_9(3^4)$ 正交实验, 正交试验的极差和方差分析如表 2 和表 3 所示.

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验设计各因素水平

水 平	因 素		
	LDL 体积质量分数	海藻糖摩尔浓度	甘油终体积百分比
	$/(w \cdot v^{-1})A$	$/(mmol \cdot L^{-1})B$	$/(v \cdot v^{-1})C$
1	8	100	1
2	9	150	2
3	10	200	3

(R, 表 2) 分析结果表明, 冷冻稀释液中 3 种保护剂对 TMS, PMI 和 CR 作用的主次顺序均为 $A > C > B$, 对 AI 作用的主次顺序为 $B > A > C$; 方差分析表明, 3 种物质对 TMS 和 PMI 均有极显著的作用($p <$

0.01), 对 CR 均无显著性作用($p>0.05$); LDL 和海藻糖对 AI 有显著性作用($p<0.05$), 甘油对 AI 无显著性作用($p>0.05$)(表 3).

表 2 $L_9(3^4)$ 正交实验设计及结果($n=8$)

实 验 号		因 素				指 标			
		A	B		C	TMS/%	PMI/%	AI/%	CR/%
R	1	1	1	1	1	29.31	23.23	46.33	25.31
	2	1	2	2	2	39.68	35.81	60.77	22.83
	3	1	3	3	3	40.51	37.85	61.19	19.36
	4	2	1	2	3	42.83	40.68	62.26	17.91
	5	2	2	3	1	41.43	37.19	63.63	20.39
	6	2	3	1	2	51.16	49.85	71.61	12.85
	7	3	1	3	2	36.58	32.13	51.53	22.36
	8	3	2	1	3	37.63	35.38	58.36	23.73
	9	3	3	2	1	35.31	31.69	58.86	25.83
TMS		8.64	6.09	0.23	7.12				
PMI		10.27	7.79	0.43	8.56				
AI		9.73	10.52	1.86	5.03				
CR		6.92	2.97	1.56	4.50				

表 3 正交试验设计方差分析

指标	方差来源	S_j	f_j	F	指标	方差来源	S_j	f_j	F
TMS	A	149.18	2	1 797.40**	PMI	A	196.58	2	640.32**
	B	55.75	2	671.65**		B	90.97	2	296.32**
	C	80.10	2	965.04**		C	127.75	2	416.13**
	e	0.08	2			e	0.31	2	
AI	A	186.67	2	27.12*	CR	A	79.81	2	17.17
	B	176.28	2	25.62*		B	15.35	2	3.30
	C	44.54	2	6.47		C	33.51	2	7.21
	e	6.88	2			e	4.65	2	

注: $F_{0.01}=99.00$, $F_{0.05}=19.00$; * 表示因素对该指标作用显著($p<0.05$), ** 表示因素对该指标作用极显著($p<0.01$).

2.3 保护剂最优组合的选择

以因素水平为横坐标, 指标(K_{ij})为纵坐标, 作出因素与指标的关系趋势图(图 2). 分别选择 K_{ij} 的最高点(指标值越大表示精子损伤程度越低的, 包括 TMS, PMI 和 AI)或最低点(指标值越小表示精子损伤程度越低的, 包括 CR, 指示精子 DNA 损伤程度)进行组合, 得到以该指标为研究对象的优化方案. 由图 2 可知, 由各个指标得到的 3 种保护剂的最佳组合均为 $A_2B_3C_2$.

2.4 各评价指标间相关分析及保护剂最优组合的确定

相关分析结果表明, TMS, PMI, AI 和 CR 间具有显著($p<0.05$)或极显著($p<0.01$)的相关性(表 4). 因此, 以 TMS, PMI, AI 和 CR 来共同评价巴马香猪冷冻—解冻后精液质量时, 指标间不存在矛盾, 可以确定巴马香猪精液冷冻稀释液中 3 种保护剂的最优组合为 $A_2B_3C_2$, 即 9%(w/v)低密度脂蛋白、200 mmol/L 海藻糖和 2%甘油.

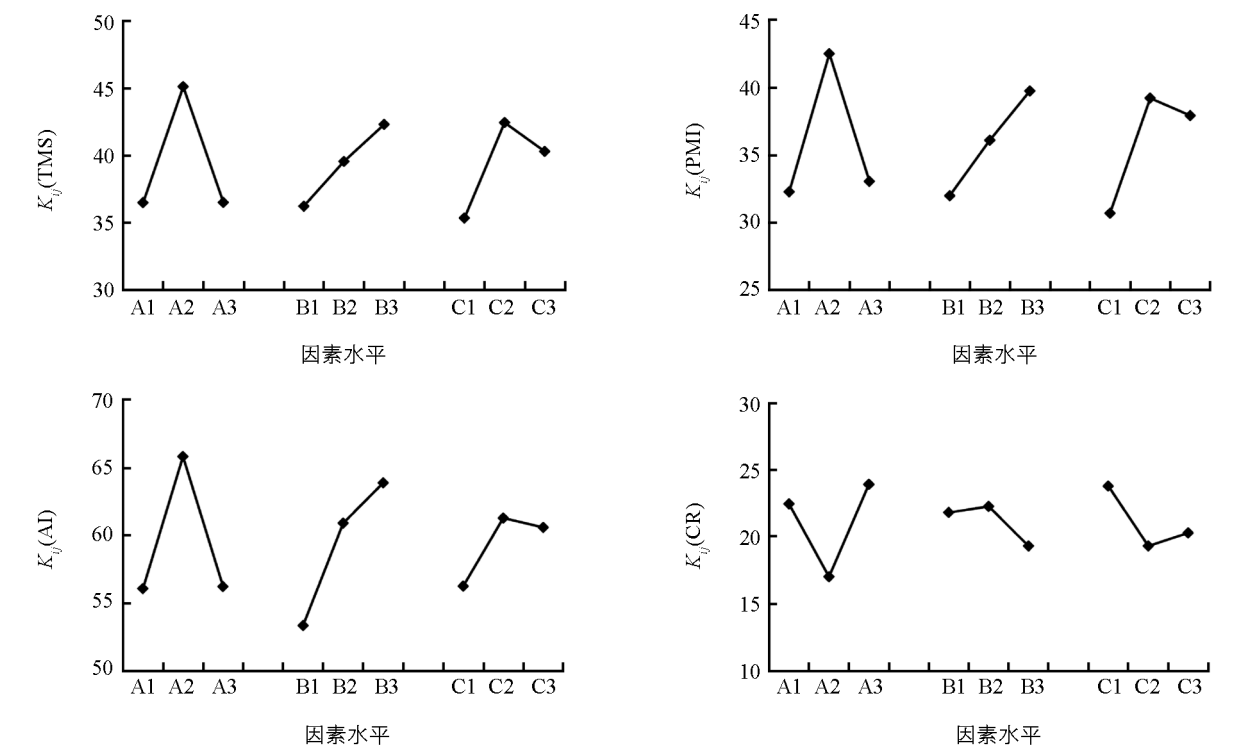


图 2 因素与指标关系趋势图

表 4 指标间相关分析及其显著性检验表

Indices	TMS	PMI	AI	CR
TMS	—	0.993 **	0.938 **	−0.928 **
PMI	0.993 **	—	0.942 **	−0.910 **
AI	0.938 **	0.942 **	—	−0.782 *
CR	−0.928 **	−0.910 **	−0.782 *	—

注: * 表示指标间相关性显著($p<0.05$), ** 表示指标间相关性极显著($p<0.01$).

3 讨 论

本研究通过多指标正交实验设计,同时使用冷冻—解冻后巴马香猪精液 TMS,PMI,AI 和 CR 评价冷冻稀释液中不同体积质量分数、体积百分比及摩尔浓度水平的 LDL、甘油和海藻糖组合的保护效果,结果表明巴马香猪精液冷冻稀释液中 LDL、甘油和海藻糖的最优组合为 A₂B₃C₂,该组合与正交实验中的 6 号实验(表 2)相同,而 6 号实验中各指标也达到了最好,表明该优化结果可靠.此外,本研究中各指标间相关性以及活率同其他 3 项指标间的回归性均为显著($p<0.05$)或极显著($p<0.01$),可见同时使用 TMS, PMI,AI 和 CR 对冷冻—解冻后精液质量进行评价时,各指标间不存在矛盾,多指标同时运用,可以从多个角度对冷冻—解冻后精液质量进行评价,从而使有关精子状态的信息更为全面、可靠,而通过这些指标筛选出的冷冻稀释液各成分的体积质量分数、体积百分比及摩尔浓度也更为合理.

甘油是渗透性保护剂^[14],在细胞冷冻悬液完全凝固之前,渗透到细胞内,在细胞内外产生一定的摩尔浓度,并与水分子结合,从而降低细胞内外未结冰溶液中电解质的摩尔浓度,保护细胞免受渗透性损伤.同时,细胞内水分也因甘油的束缚不会过分外渗,避免了细胞过分脱水皱缩.海藻糖作为一种非渗透性冷冻保护剂^[12],可以强有力地束缚细胞外液的水分子,在冰晶形成的过程中,有效地降低了细胞外液的渗透压,从而达到稳定细胞膜和蛋白质结构的效果.低密度脂蛋白(LDL)包含 85%~90%的脂质和

10%~15%的蛋白,以甘油三酯为核心外面包裹着由蛋白和磷脂组成的膜状物^[11]。在冷冻解冻过程中,由于细胞脱水引起 LDL 结构破裂,然后磷脂游离进入溶液中,在精子表面形成凝胶样的保护膜^[9],保护了细胞膜的脂蛋白复合物,从而达到保护精子的目的。可见 LDL、甘油和海藻糖可通过不同的方式在冷冻—解冻过程中减少精子受到的损伤。但是,在猪精液冷冻过程中,同时使用这 3 种保护剂对精子的保护效果还未见报道。Hu 等^[10]将 100 mmol/L 海藻糖与 2%甘油联用,冷冻—解冻后精子活率为 49.89%;Gutierrez-Perez 等^[15]将 250 mmol/L 海藻糖与 1%甘油联用,冷冻—解冻后精子活率为 42.25%;Jiang 等^[11]将 9%LDL 与 2%甘油联用,冷冻—解冻后精子活率为 49.33%。本研究同时使用 LDL、海藻糖和甘油,通过多指标正交实验设计优化出了巴马香猪精液冷冻稀释液中 LDL、甘油和海藻糖联用时的最佳体积质量分数、体积百分比及摩尔浓度分别为 9%(w/v),2%及 200 mmol/L,冷冻—解冻后精液活率为 51.16%,从而为小型猪的精液冷冻筛选出了一种较好的冷冻稀释液,有利于其实验动物的种质保存利用。

参考文献:

- [1] CHANAPIWAT P, KAEOKET K, TUMMARUK P. Effects of DHA-Enriched Hen Egg Yolk and L-Cysteine Supplementation on Quality of Cryopreserved Boar Semen [J]. Asian J Androl, 2009, 11(5): 600—608.
- [2] 罗艳梅,于明举,赵永聚,等. 夏季山羊精液不同保存方法研究 [J]. 西南大学学报:自然科学版,2010,31(4): 17—21.
- [3] VISHWANATH R, SHANNON P. Storage of Bovine Semen in Liquid and Frozen State [J]. Anim Reprod Sci, 2000, 62(1—3): 23—53.
- [4] WARD M A, KANEKO T, KUSAKABE H, et al. Long-Term Preservation of Mouse Spermatozoa After Freeze-Drying and Freezing Without Cryoprotection [J]. Biol Reprod, 2003, 69(6): 2100—2108.
- [5] BAILEY J L, LESSARD C, JACQUES J, et al. Cryopreservation of Boar Semen and Its Future Importance to the Industry [J]. Theriogenology, 2008, 70(8): 1251—1259.
- [6] GILMORE J A, LIU J, PETER A T, et al. Determination of Plasma Membrane Characteristics of Boar Spermatozoa and Their Relevance to Cryopreservation [J]. Biol Reprod, 1998, 58(1): 28—36.
- [7] GAO Da-yong, LIU Jian, LIU Cheng, et al. Prevention of Osmotic Injury to Human Spermatozoa During Addition and Removal of Glycerol [J]. Hum Reprod, 1995, 10(5): 1109—1122.
- [8] 陈田飞,吴大洋,李春峰. 冷冻保存对家蚕精液乳酸脱氢酶活性的影响 [J]. 西南农业大学学报:自然科学版,2005, 26(6): 764—768.
- [9] HU Jian-hong, LI Qing-wang, JIANG Zhong-liang, et al. Effects of Different Extenders on DNA Integrity of Boar Spermatozoa Following Freezing-Thawing [J]. Cryobiology, 2008, 57(3): 257—262.
- [10] HU Jian-hong, LI Qing-wang, JIANG Zhong-liang, et al. The Cryoprotective Effect of Trehalose Supplementation on Boar Spermatozoa Quality [J]. Reprod Domest Anim, 2009, 44(4): 571—575.
- [11] JIANG Zhong-liang, LI Qing-wang, HU Jian-hong, et al. Improvement of the Quality of Boar Cryopreservation Semen by Supplementing with Low Density Lipoprotein in Diluents [J]. Cryobiology, 2007, 54(3): 301—304.
- [12] MOUSSA M, MARINET V, TRIMECHE A, et al. Low Density Lipoproteins Extracted from Hen Egg Yolk by an Easy Method: Cryoprotective Effect on Frozen-Thawed Bull Semen [J]. Theriogenology, 2002, 57(6): 1695—1706.
- [13] HUO Li-jiang, MA Xu-hong, YANG Zhi-meng. Assessment of Sperm Viability, Mitochondrial Activity, Capacitation and Acrosome Intactness in Extended Boar Semen During Long-Term Storage [J]. Theriogenology, 2002, 58(7): 1349—1360.
- [14] HU Jian-hong, LI Qing-wang, LV Ru-kang, et al. The Advantages of Low-Density Lipoproteins in the Cryopreservation

of Bull Semen [J]. Cryobiology, 2011, 62(1): 83–87.

- [15] GUTIERREZ-PEREZ O, JUAREZ-MOSQUEDA M L, CARVAJAL S U, et al. Boar Spermatozoa Cryopreservation in Low Glycerol/Trehalose Enriched Freezing Media Improves Cellular Integrity [J]. Cryobiology, 2009, 58(3): 287–292.

Assessing and Optimizing the Freezing Diluent of Bama Miniature Boar Semen by Multi-Index Orthogonal Test

KONG De-ying¹, SHANG Hai-tao², LIU Fu-hui³,
HAN Yong¹, WEI Hong², ZHANG Jia-hua⁴

1. Department of Physiology, College of Basic Medical Science, Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563000, China;

2. Department of Laboratory Animal Science, College of Basic Medical Science, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;

3. Department of Blood Transfusion, the Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563000, China;

4. School of Animal Science and Technology, Southwest University/Chongqing Engineering Research Center for Herbivores Resource Protection and Utilization, Chongqing 400716, China

Abstract: By a multi-index orthogonal test, the effects of low-density lipoprotein (LDL, factor A), trehalose (factor B) and glycerol (factor C) used in combination were assessed and analyzed, the mass to volume ratio, molarity, and volume percentage of the three reagents were in the sequence of A>C>B on total motile sperm (TMS), plasma membrane integrity (PMI) and comet rate (CR) and of B>A>C on acrosome integrity (AI), and the optimum combination was A2B3C2. LDL, trehalose and glycerol all had significant protective effects on TMS and PMI ($p<0.05$), LDL and trehalose had significant effects on AI ($p<0.05$), and glycerol had no significant effect on AI ($p>0.05$). The relativity was significant ($p<0.05$) or highly significant ($p<0.01$) of the indexes; the regression equations between TMS and the other three indexes were effective ($p<0.01$), and the regression coefficients were all significant ($p<0.05$). It is, therefore, concluded that when TMS, PMI, AI and CR are used to assess the quality of frozen-thawed Bama miniature boar semen, no contradiction will exist between the indexes and that 9% (w/v) LDL+200 mmol/L trehalose+2% glycerol is the optimum combination of freezing diluent of Bama miniature boar semen.

Key words: Bama miniature pig; semen cryopreservation; multi-index orthogonal test; LDL; glycerol; trehalose

