

稀釋液種類對台灣水鹿精液冷藏後精液品質 及懷孕率之影響⁽¹⁾

王治華⁽²⁾ 林信宏⁽²⁾ 康獻仁⁽²⁾ 郭卿雲⁽³⁾ 宋文霖⁽²⁾
曾進輝⁽²⁾ 鄭木榮⁽²⁾ 劉炳燦⁽⁴⁾ 沈朋志⁽⁴⁾⁽⁵⁾

收件日期：99年4月6日；接受日期：99年8月5日

摘要

本試驗旨在探討稀釋液種類對台灣水鹿精液冷藏後精液品質及懷孕率之影響。結果顯示，利用電激採精法所得台灣水鹿精液之平均精子活力為 4.7；平均精子濃度為 8.9×10^8 /mL；平均精子存活率為 87.0%。以 Tris-citric acid-yolk (TCY) 及 TES-yolk (TY) 稀釋之公鹿精液於剛稀釋 (0 h) 或冷藏 12 h 後之精子活力均為 5.0，而於 citric acid-yolk (CY) 稀釋液組則自 5.0 降至 4.0；且上述3處理組於冷藏 12 h 後之精子存活率 (TCY：86.8 vs. 89.3%；TY：88.1 vs. 92.1%；CY：84.2 vs. 88.3%) 及頭帽完整性 (TCY：82.3 vs. 86.5%；TY：82.5 vs. 88.5%；CY：77.3 vs. 85.4%) 均顯著低於剛稀釋時 (0 h) ($P < 0.05$)。將 TCY、TY 或 CY 稀釋液組所冷藏 12 h 之台灣水鹿精液均分別進行人工授精後，母水鹿之懷孕率 (TCY：70%；TY：80%；CY：60%) 及分娩率 (TCY：70%；TY：80%；CY：60%) 於 3 種處理組間均無顯著差異 ($P > 0.05$)。綜合前述結果，台灣水鹿之精液應用 TY 稀釋液進行冷藏可得較佳之精液品質，且應用三種稀釋液稀釋之後精液進行人工授精皆可成功產仔。

關鍵詞：台灣水鹿、精液冷藏保存、稀釋液、精液品質、懷孕率。

緒言

家畜精液之儲存係拓展人工授精應用面之必要條件，而目前有關家畜精液之保存，主要可分為液態冷藏保存及冷凍保存 (Leboeuf *et al.*, 2000)。就液態冷藏保存而言，其目的乃主要在於測試冷凍保護劑之可行性及精子冷凍技術未臻成熟動物之精液短暫保存，其原理乃利用降溫抑制精子之

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第1597號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所高雄種畜繁殖場。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所加工組。

(4) 國立屏東科技大學動物科學與畜產系。

(5) 通訊作者，E-mail: pcschen@mail.npust.edu.tw。

代謝活動，以延長精子於體外之存活時間 (Leboeuf *et al.*, 2000)。液態冷藏的保存期限雖較冷凍保存者為短，但可減少精液繁雜之製作過程及高昂價位之冷凍器械，且保存期間內具有較佳之精子存活率及頭帽完整性。精液自公畜取得後，若要延長其於體外生存之時間長度，抑制精子的運動及其能量之消耗是要件，而降低保存溫度乃為廣泛應用之方法。曾有研究指出，以 2~7℃ 之條件保存山羊精子可延長其生存時間達一週之譜 (歐文華, 1992)。

在新鮮精液添加稀釋液過程中，影響精子存活力之因素眾多，例如冷休克 (cold shock)、冷卻速率 (cooling rate)、稀釋液成分、滲透壓 (osmotic stress) 與精子細胞膜之穩定性 (membrane stability) 等 (Cheng *et al.*, 2004)。稀釋液組成分為影響精液冷藏保存之主要因子，其組成分包括稀釋液內之緩衝物質、能量來源、抗生素與其他添加劑等。精液於低溫冷藏保存過程中，由於精子代謝產物乳酸的累積，會使精液 pH 值降低，而當達一定限度後即影響精液品質，甚至造成死亡。若欲完全抑制精子之代謝作用，則其保存溫度須低於 -130℃ 始可達成 (Medeiros *et al.*, 2002)；因此與精液等張之緩衝溶液可減緩精液於低溫保存過程中 pH 值的降低。一般常使用於精液保存之緩衝劑有磷酸鹽緩衝溶液 (phosphate buffer solution)、檸檬酸鹽緩衝溶液 (citrate buffer solution) 與三羥甲基氨基甲烷緩衝溶液 (Tris buffer solution) (Bearden *et al.*, 2004)。在牛及羊常用之精液稀釋液大多以脫脂乳粉 (skim milk powder) 或蛋黃 (egg yolk) 為基礎液 (Leboeuf *et al.*, 2000; Purdy, 2006)；而豬精液稀釋液，長久以來以蛋黃為主要基礎液 (Johnson *et al.*, 2000)。使用在鹿科動物精液之適宜稀釋液，則主要為 Tris 或檸檬酸鹽 (citrate) 為主成分之緩衝液 (Asher *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2004)。Parkinson (2001) 指出，以 Tris 和檸檬酸鹽組成之稀釋液有較佳之緩衝能力，具有穩定 pH 值之效果。一般而言，葡萄糖、果糖和乳糖等均可提供精子所需之能量；而通常精液於冷藏保存時之能量需求較冷凍保存者為高 (Parkinson, 2001)。醣類物質除作為能量來源外，亦可調整稀釋液之滲透壓；部分醣類如海藻糖 (trehalose) 則可做為精子之冷凍保護因子 (Storey *et al.*, 1998)。此外，蛋黃亦能提供精子低溫冷藏保護作用，然其保護作用機制尚不完全了解，但一般認為蛋黃所含的低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL)、卵磷脂等，可保護精子之脂蛋白鞘 (lipoprotein sheath)，避免冷休克。

目前動物生殖技術已有許多進展，惟由於鹿科動物生性敏感不易操作，因此限制其發展，但著眼於台灣水鹿極具商業利益，因此人工授精及冷藏保存技術之建立與搭配將更能發揮其效益。雖然台灣水鹿精液之冷凍保存為最終目標，然以精液冷藏保存條件作為冷凍保存技術建立之參考依據則為必要之措施，基於此，於本研究中，將首先建立台灣水鹿之電激採精法，續藉由不同稀釋液對台灣水鹿精液冷藏後精液品質及人工授精後懷孕率影響之探討，期尋得適當之稀釋液種類，以建立較佳之冷藏保存方法與人工授精流程。

材料與方法

I. 試驗動物

(i) 試驗地點：台南縣佳里鎮台鹿農產行。

(ii) 試驗動物：選擇健康、性成熟之公台灣水鹿 6 頭，體重介於 150~250 kg；進行電激採精與精液品質評估及人工授精。另選擇體重約 100 kg 之經產母水鹿進行同期化發情調控及人工授精，每組 10 頭。受試鹿隻群飼於欄舍面積為 $3.6 \times 2 \text{ m}^2$ ，簷高 4 m，設有遮陰設施。試驗期間，每日提供粗料（百慕達乾草、狼尾草、玉米青貯及苜蓿塊）及清潔飲水任食，每日每頭鹿隻於上下午各補充 250 g 精料（福壽牌泌乳羊特配料；含粗蛋白 16%、粗脂肪 2%、粗纖維 11%、粗灰分 11%、鈣 0.7%、磷 0.6%）。

II. 精液採集

公台灣水鹿以鹿隻專用固定架保定後，利用 2% 安耐寧（Chanazine 0.2%, Xylazine 20 mg/mL, Ireland）與易眠靜 1000（Imalgene 1000, Ketamine 100 mg/mL, France），1:1 比例混合之麻醉劑靜脈注射 6 mL，其後並視鹿隻個體之麻醉程度，酌量增加施打劑量，直至鹿隻達到鎮靜保定為止。麻醉保定後，以電激採精器（electroejaculator; EJ6CCGS, CGS Products PtyLtd Manufactured in Australia）採取各公鹿之精液樣品；其過程乃先將動物腹部及包皮（prepuce）外部之毛髮剔除後，以生理食鹽水（saline 0.9%, NaCl）清洗包皮內側，並清除直腸末端之糞便，再以塗抹潤滑劑之直腸探棒（rectal probe; 長 27 cm，直徑 1.5 cm，含 3 個電極面 surface electrodes），以電極面朝向腹側方置入直腸中。每次以 2 V 之固定電壓持續刺激 20 秒，停止刺激 8 秒，共循環 3 次。待精液自包皮流出後，以 50 mL 之離心管收集精液樣本，供新鮮精液性狀之分析及 4℃ 冷藏保存使用（康等，2009）。

III. 精液之冷藏保存

- (i) 各種稀釋液之配製：本試驗中公台灣水鹿之精液稀釋液配方，包括 Tris- 檸檬酸 - 蛋黃（Tris-citric acid-yolk; TCY）、Trishydroxymethyl-2- aminomethane-sulphonic acid- 蛋黃（TES-yolk; TY）或檸檬酸 - 蛋黃（citric acid-yolk; CY）等 3 種為主成分之稀釋劑；其中 TCY 係依據 Fernandez-Santos *et al.*（2006）；TY 依據 Pontbriand *et al.*（1989）；CY 則依據 Garde *et al.*（2003）所述之成分配製。
- (ii) 冷藏流程：經電激採精取得之原精液先進行性狀測定，並將活力評級為 4 級以上之精液（吳等，2002），分別以 TCY、TY 或 CY 為主成分之稀釋劑於 37℃ 下稀釋至精子濃度為 1.0×10^8 /mL。各處理組精液於稀釋後先進行各項精液品質之評估後，隨即置入 4℃ 冰箱中冷藏保存 12 h，然後再進行前述各項精液品質之評估。

IV. 精液品質之評估

新鮮精液均進行下列各項目之評估；稀釋精液於冷藏前後則僅進行精子活力等級、精子頭帽完整性及精子存活率等 3 項之評估。

- (i) 精液量（semen volume）：自各公鹿所採集之原精液，均利用微量吸管進行精液量之定量工作。
- (ii) 精子濃度（sperm concentration）：各公鹿之精液樣本均以 3% 氯化鈉（NaCl）之溶液適度稀釋後，再以紅血球計數器於正立顯微鏡下（400 倍）計算之。
- (iii) 精子活力等級（sperm motility scale）：各公鹿之精液樣品於採集 5 min 內，置於光學顯微鏡（Nikon SE）下，以懸滴六級（0~5）計分法判斷其活力（吳等，2002）。
- (iv) pH 值：以 pH meter（Sartorius, PT10 Portable Meter）直接測量所採集精液之 pH 值。
- (v) 形態異常精子之分析：利用苯胺黑-伊紅（nigrosin-eosin; NE）染色後，隨即使用顯微鏡予以評估（Ax *et al.*, 2000）。異常形態精子（abnormal sperm）可分為三種：1.第一型形態異常（primary abnormal morphology）：包括頭部與頭帽異常者。2.第二型形態異常（secondary abnormal morphology）：中片部含有原生質滴者。3.第三型形態異常（tertiary abnormal morphology）：尾部具缺陷者。
- (vi) 精子頭帽完整性（sperm acrosomal integrity）之檢測：取 100~200 μ L 之精液樣本（取樣量依精子濃度而定），先置入 2 mL 離心管中，再緩慢加入與精液等溫之 PBS 溶液至 1 mL 之最終量，經混勻後以 600 \times g 離心 5 min，且移除上清液，並重複上述步驟 3 次；第 3 次離心後，抽出上清液時，使下層剩餘 0.1~0.2 mL，再以 1:1（V:V）比例加入多

聚甲醛 (paraformaldehyde; PA) 與戊二醛 (glutraldehyde; GA) 之混合固定液, 使最終濃度為 2% 之 PA 及 0.5% 之 GA。其後, 經混勻, 再置於 4°C 冷藏 12-24 h, 以進行其固定作用。固定後之精子樣本續加入 PBS 使最終容積為 1 mL, 再以 $600 \times g$ 離心 5 min, 並重複清洗 2 次, 最後 1 次離心完畢後, 抽除 900 μL 之上清液, 並加入 100 μL 之 FITC-PNA 染色劑, 混勻後避光放置於 37°C 恆溫箱中進行 15 min 之染色。染色後之精子樣本, 利用 PBS 清洗 3 次, 並於最後 1 次清洗後遺留 200 μL 之精液, 續加入 100 μL PBS、100 μL 甘油及 10 μL propidium iodide (PI), 其後取 10 μL 之精液樣品於壓片後置於螢光顯微鏡下, 評估至少 5 個視野內之精子頭帽完整性; 其中頭帽呈現綠色螢光者表頭帽破損之精子 (Cheng *et al.*, 2004)。

- (vii) 精子存活率 (Viability) 之檢測: 利用苯胺黑-伊紅 (nigrosin-eosin; NE) 染色法評估之, 即將 5 mL 原精液與 10 mL NE 染色劑混合後做成抹片, 並置於 37°C 30 秒使抹片儘速乾燥, 再置於螢光顯微鏡下評估至少 5 個視野內之精子; 其中呈現紅色或粉紅色者表示死亡之精子。

V. 母鹿發情同期化處理與人工授精

母台灣水鹿之發情同期化處理及人工授精步驟係修正自康等 (2009) 之方法為之, 即將母鹿以鹿隻專用固定架保定後, 利用 2% 安耐寧 (Chanazine 0.2%, Xylazine 20 mg/mL, Ireland) 與易眠靜 1000 (Imalgene 1000, Ketamine 100 mg/mL, France), 1:1 比例混合之麻醉劑靜脈注射 3 mL, 其後並視鹿隻個體之麻醉程度, 酌量增加施打劑量, 直至鹿隻達到鎮靜保定為止。將含 0.3 g progesterone 之 CIDR (controlled internal drug release, CIDR. G, EAZI-breed, Australia) 置於母鹿之陰道中 (當作處理之第 1 日), 並於第 10 日肌肉注射含 250 IU 之馬絨毛膜激性腺素 (equine chorionic gonadotropin, eCG, 中國化學製藥), 第 12 日移除 CIDR, 並同時肌肉注射 2 mL 含 250 $\mu g/mL$ 之 PGF2 α (Estrumate, Schering-Plough, Australia)。在 CIDR 移除後, 即將該等母鹿群每 4-5 頭區分於同一飼養欄舍, 並在每一飼養欄舍分別放入 1 頭已將輸精管結紮之試情公鹿, 為期 1-2 天。此期間均以監視器電腦錄影, 24 h 全天候監控試驗母鹿之發情狀況, 並以願被試情公鹿或其他母鹿穩定駕乘者, 界定其為發情者。已確定發情之母鹿於穩定駕乘後之 12 h, 即依試驗所需分別將經三種稀釋液稀釋後之冷藏精液以直腸把握法配合人工授精槍進行人工授精; 並於授精後第 60 日後以直腸觸診判定其懷孕與否。已確診懷孕之母鹿則飼養於同一欄舍, 靜待分娩。

VI. 試驗設計

試驗一: 冷藏稀釋液種類對台灣水鹿精液冷藏後精液品質之影響

本試驗首先針對 6 頭不同個體之公水鹿進行電激採精法取得其精液樣本, 用以評估此法取得之精液應用於後續試驗之可行性。經評估後, 具較佳精液品質之公鹿, 續利用此法採集其精液, 再分別以 TCY、TY 與 CY 三種精液冷藏稀釋液進行稀釋, 隨即於 4°C 條件下冷藏 12 h, 並於稀釋後之第 0 及第 12 h 評估該等精液之精子活力、存活率與頭帽完整性。

試驗二: 冷藏稀釋液種類人工授精後受胎率與產仔率之影響

經 TCY、TY 與 CY 三種稀釋液稀釋之精液經 4°C 冷藏 12 h 後, 分別予以執行人工授精。在配種後第 60 日後以直腸觸診法判定其懷孕率, 並於母鹿分娩後記錄其產仔率。

VII. 統計分析

本試驗所收集之公水鹿精液性狀之各項數值, 均以平均值 \pm 標準機差 (Mean \pm Standard error

of mean, $\bar{X} \pm \text{SEM}$) 表示之。試驗所得之各項精液性狀數據，均使用統計分析系統 (statistical analysis system, SAS 9.1, 2005) 套裝軟體中之一般線性模式 (General Linear Models) 進行變方分析，並進一步以鄧肯氏多變域測定法 (Duncan's Multiple Range Test) 比較處理間之差異性。

結果與討論

我國台灣水鹿之飼養雖已有多多年，但由於鹿科動物生性膽怯，馴化程度不足，且於生殖季節中尤具攻擊性，不易訓練以假陰道進行採精，是以，本研究之試驗一乃首先評估應用電激採精法進行公台灣水鹿精液採集之可行性，其結果如表 1 所示。由表 1 之結果顯示 6 頭性成熟公台灣水鹿精液之各精液性狀，其平均精液量為 $1.2 \pm 0.6 \text{ mL}$ 、pH 值為 7.1 ± 0.1 、精子濃度為 $8.9 \pm 3.3 \times 10^8 / \text{mL}$ 、精子活力則為 4.7 ± 0.4 、平均精子存活率為 $87 \pm 4.8\%$ 。本試驗所得之平均精子濃度及精液量均遠低於王 (2003) 利用相同方法所取得之公台灣水鹿精液的精子濃度 ($1.9\sim 2.2 \times 10^9 / \text{mL}$) 及精液量 ($2.0 \pm 0.2 \text{ mL}$)，但精子活力則略優於該作者之數值 (3-5 級分)；惟本試驗中之精液量則與吳等 (2002) 之研究結果相近 ($1.4 \pm 0.7 \text{ mL}$)；但其他精液性狀則優於該研究所述 (精子濃度： $5.57 \pm 3.45 \times 10^8 / \text{mL}$ ；精子活力：4 級分)；相同之趨勢亦見於 Chen *et al.* (2004) 之研究中 (精液量： $1.3 \pm 0.5 \text{ mL}$ ；精子濃度： $3.8 \pm 2.5 \times 10^8 / \text{mL}$)。此外，由表 1 中之數據也發現所採集公鹿之精液量最高者有 2.4 mL ，最低者為 0.6 mL ；精子濃度最高者有 $15.7 \times 10^8 / \text{mL}$ ，最低者為 $4.1 \times 10^8 / \text{mL}$ ，這說明公鹿個體間之精液品質具極大之差異性，相同之論述已在王 (2003) 針對台灣水鹿精液品質之研究中被証實。本研究所採集 6 頭公台灣水鹿之各項精液性狀中，作為人工授精及冷凍精液製作較為重要之精子活力與存活率等兩項指標均甚佳；且鄭 (2006) 之研究也顯示以電激採精法取得之台灣山羌精液量及精子活力和濃度均顯著優於利用假陰道採精法者。因此，利用電激採精法採取台灣水鹿之精液為可行之策，且所得之精液可應用於後續之冷藏研究。

表 1. 公台灣水鹿之精液性狀

Table 1. The semen traits of individual Formosan sambar stag

Traits	Individual									Mean	S.D
	A	B	A	C	B	B	D	E	F		
Age, year	5	15	5	14	15	15	9	5	7		
Semen volume (mL)	0.7	0.9	0.8	1.6	0.6	1.0	1.7	2.4	1.8	1.2	0.6
Motility (0-5)	5	5	4	5	5	5	5	5	4	4.7	0.4
Semen concentration ($\times 10^8 / \text{mL}$)	10.2	9.0	7.8	6.7	4.1	6.5	9.0	15.7	11.6	8.9	3.3
Abnormal morphology (%)	8.7	9.0	18.5	9.8	10.3	9.5	11.3	9.7	14.5	11.2	3.2
Sperm viability (%)	86	90.2	89	85	80.5	91.3	90.5	92.3	78.7	87.0	4.8
pH	7.0	7.3	7.3	6.9	7.4	7.2	7.2	7.2	7.2	7.1	0.1

本研究中，公台灣水鹿精液應用不同稀釋液冷藏 12 h 期間，其各項精液品質之數據如表 2。由表 2 之結果顯示，公鹿精液分別以 TCY、TY 或 CY 稀釋液稀釋後隨即 (0 h) 評估其精子活力則各處理組別均為 5.0；但冷藏 12 h 後，利用 CY 稀釋者則降為 4.0，顯著低於其他兩組 ($P < 0.05$)。在稀釋後隨即評估精子存活率及頭帽完整性，則發現利用 TY 稀釋組者最高 (存活率：92.1%；頭帽完整性：88.5%)、TCY 稀釋組者次之 (存活率：89.3%；頭帽完整性：86.5%)、CY 稀釋組者最低 (存活率：88.3%；頭帽完整性：85.4%)，且兩數值於 3 個處理組間均具有顯著差異 ($P < 0.05$)。在冷藏 12 h 後之精子存活率 (TY：88.1%；TCY：86.8%；CY：84.2%) 亦得相同趨勢 ($P < 0.05$)；但頭帽完整性則以 TY 及 TCY 稀釋者 (82.5 和 82.3%) 顯著高於 CY 稀釋者 (77.3%) ($P < 0.05$)。相似之試驗也證實利用 TCY 與 TY 為稀釋液所冷凍之台灣水鹿精液，在解凍後之精子存活率及頭帽完整性，均優於利用 CY 稀釋者；而於臺灣梅花鹿則以 TY 為稀釋液所冷凍之精液於解凍後顯著較利用 TCY 與 CY 稀釋者之精子存活率及頭帽完整性更佳 (Cheng *et al.*, 2004)。在 Parkinson (2001) 之研究指出，以 Tris 和 Citric acid 組成之稀釋液具有較佳之緩衝效果，可穩定稀釋精液之 pH 值，此可能是本研究中，含有 Tris 之 TCY 與 TY 等兩組精液冷藏 12 h 後明顯較不含 Tris 之 CY 組之精子活力、存活率與頭帽完整性均較高之重要關鍵。此外，本試驗也顯示利用上述三種稀釋液所稀釋之精液於冷藏 12 h 後之精子存活率及頭帽完整性均顯著較各組剛稀釋時 (0 h) 為低 ($P < 0.05$)。此因欲完全抑制精子之代謝作用，其保存溫度須低於 -130°C 始可達成 (Medeiros *et al.*, 2002)；而在 4°C 時上述各稀釋液雖可延長精液之使用期限，但冷藏之精子仍有少許代謝及生化反應持續進行，如精子代謝產物-乳酸的累積，將使精液 pH 值降低，而當 pH 值達一定限度後即會降低精液品質，並進而增加精子之死亡率 (Bearden *et al.*, 2004)。綜合本試驗之各項測定數值，發現在精子存活率方面，不論於剛稀釋時 (0 h) 或稀釋後之第 12 h，均以 TY 稀釋液組者顯著較其他兩組者為高。相似之結果亦曾在 Cheng *et al.* (2004) 之研究中証實。而該研究雖顯示以 TCY 與 TY 為稀釋液所冷凍之台灣水鹿精液於解凍後之精子存活率相近，但正常精子的比率則仍以 TY 稀釋液組者顯著較高。因此，整體而言，利用 TY 為稀釋液進行台灣水鹿精液之保存仍是較佳之選擇。在本試驗中之 TCY 稀釋液組僅添加果糖，而 TY 稀釋液組則添加果糖與葡萄糖。曾有研究指出，稀釋液中添加之果糖，其主要功能在於改善精子冷藏或冷凍後之頭帽完整性，而葡萄糖則具有增加精子細胞膜安定性之能力 (Fernandez-Santos *et al.*, 2007)。此可能為本研究中含有果糖與葡萄糖之 TY 稀釋液組較僅含有果糖之 TCY 稀釋液組者具較高精子存活率之主要原因。

表 2. 稀釋液種類對台灣水鹿精液冷藏 (4°C) 期間精子活力、存活率和頭帽完整性之影響

Table 2. Effects of extenders on sperm motility score, sperm viability and acrosome integrity of Formosan sambar stag semen after cooling at 4°C for different duration

Items	0 h storage			12 h storage		
	TCY ⁽¹⁾	TY ⁽²⁾	CY ⁽³⁾	TCY	TY	CY
SMS ⁽⁴⁾ (0-5)	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	4±0 ^b
VIAB ⁽⁵⁾ (%)	89.3±0.7 ^b	92.1±0.9 ^a	88.3±0.8 ^c	86.8±0.5 ^d	88.1±0.8 ^c	84.2±1.0 ^e
NAR ⁽⁶⁾ (%)	86.5±0.7 ^b	88.5±0.3 ^a	85.4±1.0 ^c	82.3±0.6 ^d	82.5±0.6 ^d	77.3±0.7 ^e

⁽¹⁾ Tris-citric-base medium; ⁽²⁾ TES-base medium; ⁽³⁾ Sodium citrate-base medium; ⁽⁴⁾ Sperm motility score; ⁽⁵⁾ Sperm viability; ⁽⁶⁾ Acrosome integrity.

a, b, c, d, e Values without same superscripts in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

精液性狀之評估雖為檢測公畜繁殖能力與精液稀釋液條件之重要指標，但若能直接進行人工授精以評估其懷孕率，則更能正確反應試驗之效果。因此於試驗二，延續試驗一之結果，利用 TCY、TY 或 CY 稀釋液稀釋並冷藏 12 h 之台灣水鹿精液分別進行人工授精，其結果顯示母水鹿之懷孕率在以 3 種稀釋液稀釋冷藏處理之各組間均相近（TCY：70%；TY：80%；CY：60%），且在 3 試驗處理組之每頭懷孕母鹿均各成功分娩 1 頭仔鹿（表 3）。而 3 試驗處理組之平均懷孕率為 70%（21/30），此與同時期利用自然配種之懷孕率為 80%（64/80）者相近。此顯示應用本試驗之冷藏精液進行人工授精或可取代自然配種法。本試驗中母鹿經冷藏精液人工授精之懷孕率較國外於紅鹿和黇鹿（47.3~76.3%）（Asher *et al.*, 1992；Asher *et al.*, 1993; Jabbour *et al.*, 1993），以及梅花鹿者（50~53.3%）（Willard *et al.*, 1996）均具有較高之懷孕率。此外，本研究室先前應用冷藏之台灣水鹿精液採複配方式進行人工授精獲得 88.9%（8/9）之懷孕率（康等，2009），此與本研究所得結果並無顯著差異。由此說明母台灣水鹿只需執行 1 次之人工授精即可獲致極高之懷孕率。綜合前述之結果，顯示本試驗已初步建立台灣水鹿之電激採精法，且可應用 TY 稀釋液進行公台灣水鹿精液之冷藏保存，而實施 1 次人工授精可應用於母台灣水鹿之配種。

表 3. 稀釋液種類對台灣水鹿冷藏精液人工授精後懷孕率之影響

Table 3. Effect of extenders on the pregnant rate of Formosan sambar hinds inseminated with cooled semen

Treatment	No. of service	No. (%) of pregnancy ^a	No. (%) of parturient does ^a
TCY ⁽¹⁾	10	7 (70)	7 (70)
TY ⁽²⁾	10	8 (80)	8 (80)
CY ⁽³⁾	10	6 (60)	6 (60)

⁽¹⁾ Tris-citric-base medium; ⁽²⁾ TES-base medium; ⁽³⁾ Sodium citrate-base medium.

^a No significant differences were detected among treatment groups ($P > 0.05$).

誌謝

本試驗承台灣省養鹿協會理事長林昆鋒與黃秋英女士的協助，使試驗得以順利完成，謹此誌謝。

參考文獻

- 王俊強。2003。牡台灣水鹿生殖功能之一年內變化與精液之冷凍保存。東海大學畜產學系，碩士論文。
- 吳瑞得、董光中、馮翰鵬、郭財榮、蔡沛學、鄭豐邦。2002。畜養牡台灣梅花鹿及牡台灣水鹿之生殖性狀分析：以直腸電激採精法進行精液性狀評估。台灣獸醫誌 28: 204-210。
- 康獻仁、王治華、沈朋志、劉炳燦。2009。台灣水鹿發情同期化及人工授精技術之建立。畜產研究 42(3): 199-209。
- 歐文華。1992。羊之繁殖與障礙。華香園出版社，台北，pp. 87-88。

- 鄭鈞尹。2006。台灣山羌之睪丸活動性與茸角週期之研究。屏東科技大學畜產學系。碩士論文。
- Asher, G. W., D. K. Berg and G. Evans. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 195-211.
- Asher G. W., C. J. Morrow and H. N. Jabbour. 1992. Laparoscopic intra-uterine insemination of fallow deer with frozen-thawed or fresh semen after synchronization with CIDR devices. *NZ. Vet. J.* Mar 40(1): 8-14.
- Asher, G.W., M. W. Fisher, P. F. Fennessy, C. G. Mackintosh, H. N. Jabbour and C. J. Morrow. 1993. Oestrous synchronization, semen collection and artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). *Anim. Reprod. Sci.* 33: 241-265.
- Ax, R. L., M. Dally, B. A. Didion, R. W. Lenz, C. C. Love, D. D. Varner, B. Hafez and M. E. Bellin. 2000. Semen evaluation. in: *Reproduction in farm animals*. Hafez, E. S. E. and B. Hafez (eds.) Lippincott Williams & Willkins, South Carolina, USA, pp. 365-375.
- Bearden, H. J., J. W. Fuquary and S. T. Willard. 2004. Semen processing, storage, and handling. in: *Applied animal reproduction*. Prentice Hall, USA, pp.198-221.
- Chen, F. P., J. T. Wu, J. P. W. Chan, J. S. Wang, H. P. Fung, B. Colenbrander and K. C. Tung. 2004. The effect of different extender on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. *Theriogenology* 66: 1605-1616.
- Fernandez-Santos, M. R., M. C. Estes, V. Montoro, A. J. Soler and J. J. Garde. 2006. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology* 66: 1931-1942.
- Fernandez-Santos, M. R., F. Martinez-Pastor, V. Garcia-Macias, M. C. Estesi, A. J. Soler, P. Paz, L. Anel and J. J. Garde. 2007. Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 67: 738-753.
- Garde, J. J., A. J. Soler, J. Cassinello, C. Crespo, A. F. Malo, G. Espeso, M. Gomendio and E. R. S. Roldan. 2003. Sperm cryopreservation in three species of endangered gazelles (*Gazella cuvieri*, *G. dama mhorri*, and *G. dorcas neglecta*). *Biol. Reprod.* 69: 602-611.
- Jabbour, H. N., F. A. Veldhuizen, G. Green and G. W. Asher. 1993. Endocrine response and conception rates in fallow deer (*Dama dama*) following oestrous synchronization and cervical insemination with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 98: 495-502.
- Johnson, L. A., K. F. Weitze, P. Fiser and W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 143-172.
- Leboeuf, B., B. Restall and S. Salamon. 2000. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 113-141.
- Medeiros, C. M. O., F. Forell, A. T. D. Oliveirera and J. L. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why is not better? *Theriogenology* 57:327-344.
- Parkinson, T. 2001. Artificial insemination. in: *Arthur's veterinary reproduction and obstetrics*. D. E. Noakes, T. J. Parkinson, G. C. W. England and G. H. Arthur (eds), W. B. Saunders, London. pp. 751-778.
- Pontbriand, D., J. G. Howard, M. C. Schiewe, L. D. Stuart and D. E. Wildt. 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26: 341-354.

- Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small. Rumi. Res. 63: 215-225.
- Stanic, P., M. Tandara, Z. Sonicki, V. Simunic, B. Radakovic and E. Suchanek. 2000. Comparison of protective media and freezing techniques for cryopreservation of human semen. EUR. J. OBSTET. GYN. R. B. 91 : 65-70.
- Storey, B. T., E. E. Noiles and K. A. Thompson. 1998. Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. Cryobiology 37: 46-58.
- Wani, N. A., M. Billah and J. A. Skidmore. 2008. Studies on liquefaction and storage of ejaculated dromedary camel (*Camelus dromedarius*) semen. Anim. Reprod. Sci. 109: 309-318.
- Willard, S. T., D. M. Hughes, J. M. Bringans, R. G. Sasser, D. R. White, J. T. Jaques, R. W. Godfrey, T. H. Welsh and R. D. Randel. 1996. Artificial insemination, hybridization and pregnancy detection in sika deer (*Cervus nippon*). Theriogenology 46: 779-789.

Effects of extenders on the quality and fertility of cooled Formosan sambar stag semen ⁽¹⁾

Chih-Hua Wang⁽²⁾ Hsin- Hung Lin⁽³⁾ Shann-Ren Kang⁽²⁾

Ching-Yun Kuo⁽³⁾ Wen-Lin Song⁽²⁾ Chin-Hui Tseng⁽²⁾

Mu-Jung Cheng⁽²⁾ Bing-Tsan Liu⁽⁴⁾ and Perng-Chih Shen⁽⁴⁾⁽⁵⁾

Received : Apr. 6, 2010 ; Accepted : Aug. 5, 2010

Abstract

The aim of this study was to examine the effects of extenders on the quality and fertility of cooled Formosan sambar stag semen after artificial insemination. Result showed that the sperm motility score (SMS), sperm concentration, and sperm viability (VIAB) of Formosan sambar stag semen collected by electro-ejaculation were 4.7, 8.9×10^8 sperms/mL and 87.0%, respectively. The SMS of semen diluted with TCY or TY extenders were not decreased by cooling at 4°C for 12 h (5.0 and 5.0), but those of semen diluted with CY extender were decreased from 5.0 to 4.0 ($P < 0.05$). The VIAB (TCY: 86.8 vs. 89.3%; TY: 88.1 vs. 92.1%; CY: 84.2 vs. 88.3%) and acrosomal integrity (NAR) (TCY: 82.3 vs. 86.5%; TY: 82.5 vs. 88.5%; CY: 77.3 vs. 85.4%) of the semen diluted with TCY, TY or CY extenders and cooled at 4°C for 12 h were significantly lower ($P < 0.05$) than those of semen freshly diluted with these extenders without cooling storage (0 h). The pregnant rates (TCY: 70%; TY: 80%; CY: 60%) and parturient rates (TCY: 70%; TY: 80%; CY: 60%) were similar among estrus synchronized Formosan sambar hinds after artificial insemination with the stag semen diluted with TCY, TY or CY extenders cooled at 4°C for 12 h. In conclusion, Formosan sambar stag semen diluted with TCY or TY extenders had a better sperm quality. Despite of the extender used, the pregnant rate and the parturient rate after AI using the cooled semen were not affected.

Key words : Formosan sambar deer, Semen cooling storage, Extender, Semen quality, Pregnant rate.

(1) Contribution No. 1597 from Livestock Research Institute (LRI), Council of Agriculture (COA).

(2) Kaohsiung Animal Propagation Station, LRI, COA.

(3) Animal Products Processing Division, LRI, COA, Hsinhua 712, Tainan, Taiwan, R. O. C.

(4) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology.

(5) Corresponding author, E-mail: pcshen@mail.npust.edu.tw.