

題目 菜鴨及番鴨之精液冷凍

報告人 蕭孟衿

執行成果

全球暖化環境劇變，導致許多物種消失或已瀕臨絕種，而家畜禽方面由於人類長期以來的選育造成遺傳資源的快速銳減，許多基因因此大量流失，這些已經成為國際上共同的問題。現代生物技術日新月異，除了以活體方式保存種原亦可體外保存精液、基因體與製作基因組基因庫等；冷凍精液和遺傳物質的保存可保留原始基因庫，確保基因再現，以供未來生產和研究之用，另外亦可減少活體保存數目，降低保種成本。養鴨為台灣重要的家禽事業之一，為避免因長期選拔而使優良基因流失，建立鴨隻精液之冷凍保存方法有其必要性，如此不但可保存本土珍貴鴨隻遺傳資源且可降低惡性傳染病帶來的滅種危機(如禽流感等)。

長久以來，動物精液冷凍保存與人工授精技術之應用，對動物人工生殖、種原保存及家畜遺傳改良等方面具有相當的貢獻。冷凍保存過程中溫度改變之傷害、冷凍傷害、冰晶形成與裂解、精子獲能效應之改變、運動力損失及氧化損傷等皆可能造成精子構造、功能上損傷及存活率的下降，導致後續解凍後受精率降低。關於精液冷凍保存的研究，在家禽中以雞最早，Shaffner 等人於 1941 年進行雞精子冷凍首次獲得成功，並於次年得到幾個冷凍精液解凍後得到的受精蛋，但這些受精蛋都在胚胎發育的早期(10-15 小時)死亡；世界上初次孵化出雞冷凍精液後代的是 Polge 等人在 1951 年完成的，但受精率很低僅為 0.5%。家禽在冷凍精液上的發展遠不及家畜，家禽冷凍精液研究雖然已有 60 多年的歷史，但是仍然處於實驗階段，在家禽生產中還沒有很好的推廣與應用。

關於家禽冷凍精液研究最多首推雞精液之冷凍，火雞、鵝等亦有之，鴨冷凍精液相關研究相對來說少很多且受精率普遍不佳，分所近幾年投注不少精力於鴨精液冷凍保存技術之研究，希望能有所突破。

以下為歷年試驗結果:

試驗(一)

針對不同稀釋液與不同冷凍保護劑進行試驗，解凍後以 Nigrosin-Eosin 染色法評估精子存活率。菜鴨新鮮精子活力判定約為 3~4 級，存活率為 72%，經冷凍過後各處理組的精子活力約為 1 級，存活率介於 13~20% (表 1)，以含有 4% DMSO 的 Modena 稀釋液製作的冷凍精液，存活率為最佳(20.33%)；番鴨新鮮精子活力約為 4~5 級，存活率為 84%，經冷凍過後各處理組的精子活力約為 1~2 級，存活率介於 16~32% (表 5)，以含有 4% DMSO 的 Modena 稀釋液製作的冷凍精液，存活率為最佳(32.33%)。由試驗可知對於鴨隻精液而言，冷凍保護劑 DMSO 優於 DMA；在稀釋液方面，對菜鴨冷凍精液來說 Modena 稀釋液優於 Safe Cell 稀釋液，對番鴨則差異不大。以含有 4% DMSO 的 Modena 稀釋液稀釋精液製備冷凍精液，進行人工授精後第二天菜鴨受精率為 5%。

表 1. 不同冷凍保護劑與稀釋液對菜鴨精子經冷凍-解凍過程之存活率

Cryoprotectants	Modena Extender (% of live spermatozoa)	Safe Cell Extender (% of live spermatozoa)
9% DMA	15.67	13.00
4%DMSO	20.33	15.67

表 2. 不同冷凍保護劑與稀釋液對番鴨精子經冷凍-解凍過程之存活率

Cryoprotectants	Modena Extender (% of live spermatozoa)	Safe Cell Extender (% of live spermatozoa)
9% DMA	17.67	16.33
4%DMSO	32.33	29.33

試驗(二)

將稀釋液改為含有 15% 蛋黃之 5.7% 葡萄糖液並以 9% DMA 當作冷凍保護劑，在 45°C 或 4°C 解凍後進行精子螢光染色，三隻番鴨之精子存活率如表 3，其中 J-107 個體之精子存活率較高且 4°C 解凍後之精子存活率高於 45°C 解凍處理組，而另外兩個體則差異不大；表 4 為不同番鴨個體以 4°C 解凍後之精子存活率，結果顯示個體間差異頗大，最低為 7%，最高為 26%，公鴨精子耐凍能力之個體差異，可能是生理上之原因，但也不能排除遺傳上差異所致之可能性，此外由 J-107 個體亦可知不同時間所採集製備之冷凍精液，其精子存活率不盡相同，推測可能因為不同時間所收集之精液品質雖同一個體但仍會有所差異，或者是因為實驗誤差所造成，其真正原因為何需要更進一步的研究探討。將表 4 精子存活率大於或接近 20% 之個體精液混合後進行人工授精，由於照蛋看不出有受精蛋，故將蛋打破觀察其胚點，發現約有二成為非常早期即死亡的中止胚。

表 3. 不同解凍溫度之番鴨精子存活率

Duck number	45°C thaw (% of live spermatozoa)	4°C thaw (% of live spermatozoa)
J-107	18	24
I-106	3	4
I-216	9	9

表 4. 4°C 解凍後不同個體之番鴨精子存活率

2005.8.19		2005.8.25		2005.8.30	
Duck number	% of live spermatozoa	Duck number	% of live spermatozoa	Duck number	% of live spermatozoa
J-107	19	J-107	18	J-107	26
J-113	7	J-121	25	J-307	16
J-114	14	I-104	11	J-414	21
J-116	9	I-110	13	J-516	26

試驗(三)

採集番鴨與菜鴨之精液進行下述之實驗。試驗 A：番鴨精液經不同試驗條件測試後，發現以含有 5 % 甘油和 10 % DMA 的稀釋液製備冷凍精液，其解凍後精子活力較佳，平均存活率為 26 % (表 5)，但不同個體之間差異頗大，以此法製備番鴨冷凍精液後，挑選活力及存活率較佳的 156 劑冷凍精液，進行人工授精，結果受精率為 0 %。試驗 B：菜鴨精液經不同試驗條件測試後，發現含有蛋黃之稀釋液解凍後精子活力較差，而含有 5 % 甘油和 5 % DMA 的稀釋液所製備之冷凍精液，其解凍後精子活力較佳，平均存活率為 17 % (表 5)。試驗 C：菜鴨精液稀釋後加入 10 % DMA，靜置於液態氮上方，解凍後精子平均存活率為 37 % (表 5)，顯著高於試驗 B 之結果。由表 5 可知不論是番鴨或者菜鴨，不同個體間精子解凍後存活率差異頗大，本試驗結果與前人研究顯示之活力及存活率差距頗大，應為不同的試驗方法所致。

表 5. 番鴨和菜鴨不同冷凍處理之精子存活率

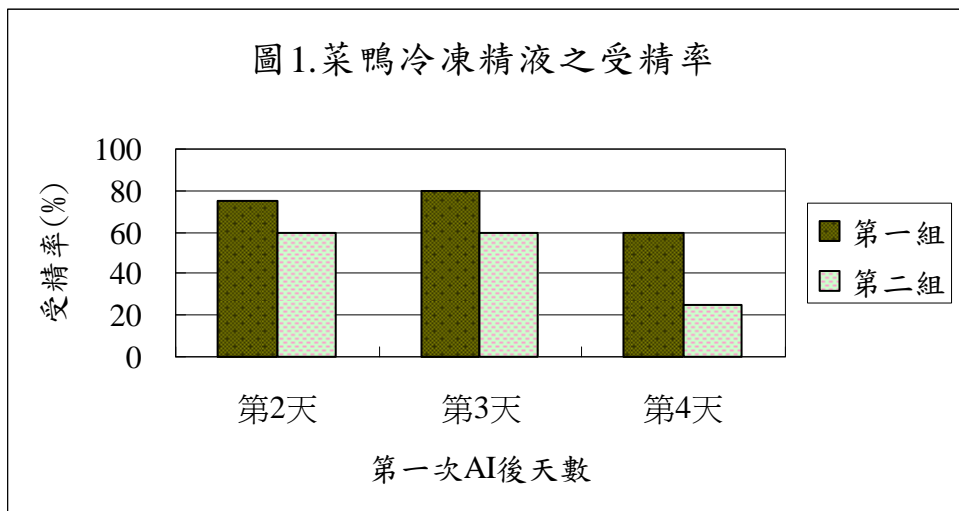
番鴨		菜鴨			
試驗 A		試驗 B		試驗 C	
鴨號	精子存活率 (%)	鴨號	精子存活率 (%)	鴨號	精子存活率 (%)
I-112	31	B-807	11	B-814	43
I-123	20	B-808	17	B-821	41
I-221	27	B-813	22	B-822	28
平均精子存活率 (%)	26	平均精子存活率 (%)	17	平均精子存活率 (%)	37

註：試驗 A 以含有 5 % 甘油和 10 % DMA 的稀釋液製備冷凍精液，靜置於乾冰上。

試驗 B 以含有 5 % 甘油和 5 % DMA 的稀釋液製備冷凍精液，靜置於乾冰上。

試驗 C 以含有 10 % DMA 的稀釋液製備冷凍精液，靜置於液態氮上方。

以上述試驗 C 之方法製備菜鴨冷凍精液，分成二組進行授精試驗，第一組連續注精二天，第二組僅進行人工授精一次，結果如圖 1，第一組授精後第二天、第三天及第四天之受精率分別為 75 %、80 % 和 60 %，平均受精率為 71 %；第二處理組則分別為 60 %、60 % 和 25 %，平均受精率為 50 %。只進行一次人工授精其受精率在第四天明顯較連續二天進行人工授精者下降許多，此一結果與 Tai *et al.* (2001) 利用鵝所做之試驗結果相似。



目前利用修改過後的試驗方法進行菜鴨冷凍精液之人工授精，受精率可達80%，番鴨冷凍精液之受精率則為35%。由於番鴨精液之冷凍仍需克服瓶頸，未來可朝數個方向努力(一)研究更好的冷凍保護劑、稀釋液、解凍液，同時進一步探索較好的冷凍方法，以提高冷凍精液的精子存活率及完整性。(二)從理論上研究冷凍過程中精子內部物質發生的變化，揭示溫度對家禽精子影響和家禽精液冷凍之機轉，探索影響精子凍後存活的內外因素。(三)選育精子耐凍性強的公禽品系。分所將持續進行鴨隻冷凍精液之研究以改善其受精率，以期維持我國本地鴨隻遺傳資源的永續利用。