

# 台灣水鹿發情同期化及人工授精技術之建立<sup>(1)</sup>

康獻仁<sup>(2)</sup> 王治華<sup>(2)</sup> 沈朋志<sup>(3)</sup> 劉炳燦<sup>(3)(4)</sup>

收件日期：97年2月1日；接受日期：97年12月12日

## 摘要

本研究旨在建立台灣水鹿之發情同期化與人工授精技術。試驗一係評估母台灣水鹿於 CIDR 發情同期化處理期間之血清中助孕酮 (SP<sub>4</sub>) 濃度變化。結果顯示，母台灣水鹿於 CIDR 埋植之第 0、8 及 12 日，其 SP<sub>4</sub> 濃度分別為  $1.97 \pm 0.05$ 、 $8.27 \pm 4.47$  和  $6.15 \pm 1.66$  ng/mL；而於相同時段之對照組母鹿（未 CIDR 埋植者），其 SP<sub>4</sub> 濃度則分別為  $0.50 \pm 0.24$ 、 $3.49 \pm 0.39$  和  $2.26 \pm 1.02$  ng/mL。其中各分析時段之 SP<sub>4</sub> 濃度均以 CIDR 埋植組母鹿明顯高於對照組母鹿 ( $P < 0.05$ )。試驗二係評估經 CIDR 埋植搭配 eCG 發情同期化處理之母鹿發情率與自然配種懷孕率。結果顯示，母鹿經 CIDR 搭配 eCG 發情同期化處理後之發情率為 85.7% (12/14)，此 12 頭發情母鹿經公鹿配種後有 10 頭懷孕，且 10 頭懷孕母鹿均成功分娩仔鹿。試驗三的目的則在探討稀釋液種類對母台灣水鹿經冷藏精液人工授精後懷孕率之影響。結果顯示，母台灣水鹿經 Tris-Yolk 稀釋液稀釋後之精液人工授精後，其懷孕率 (75.0%) 與分娩率 (75.0%) 均與該母鹿經 Citrate-Yolk 稀釋液稀釋之精液人工授精者並無顯著差異 (100.0% 和 100.0%)。綜合上述結果發現，利用 CIDR 搭配 eCG 發情同期化處理母台灣水鹿可得極高之發情率；發情母鹿經人工授精後之懷孕率及分娩率均高達 88.9%。本試驗之結果，已成功建立台灣水鹿之發情同期化與人工授精技術。

關鍵詞：台灣水鹿、血清助孕酮濃度、同期化發情、人工授精、精液稀釋液。

## 緒言

發情同期化處理技術之應用除有利飼養者不需耗費額外時間用於發情觀察，使母畜群同時於特定時機進行人工授精，而便於牧場管理之優勢外 (King *et al.*, 1982)，尤其在相關生殖科技研究中，需進行胚移置，供胚與受胚母畜生理週期之同期化搭配，更被視為必備之技術 (Bearden *et al.*, 2004a)。

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1500 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所高雄種畜繁殖場。

(3) 國立屏東科技大學動物科技與畜產系。

(4) 通訊作者，E-mail: tml19@mail.npust.edu.tw。

曾有研究指出，當單獨應用  $\text{PGF}_{2\alpha}$  處理處於動情週期黃體期之母牛，確實具有誘發發情之效果，惟若試驗母牛處於動情週期濾泡期或黃體期之早期時，則均無法有此效果 (Fortune *et al.*, 1991)。應運而生之策略，乃採用間隔 11 至 14 天分別施打兩劑  $\text{PGF}_{2\alpha}$  之流程，則至少可涵蓋一次之黃體期，且其誘導之發情效率與處於黃體期之母牛僅一劑處理者相近 (Lucy and Stevenson, 1986; Larson and Ball, 1992)；但無論如何，僅單獨應用  $\text{PGF}_{2\alpha}$  處理之母畜群，其個體間之發情同期化的一致性仍有極大之變異。因此，目前應用於家畜發情同期化之處理模式，均採取包括解黃體藥劑 (如  $\text{PGF}_{2\alpha}$ )、排卵藥劑 (如 GnRH 和 hCG)、濾泡發育藥劑 (如 eCG 和 FSH) 以及助孕素 (如 CIDR) 等藥劑之搭配使用 (Bearden *et al.*, 2004)。Pursley *et al.* (1995) 利用 CIDR 搭配  $\text{PGF}_{2\alpha}$  處理母牛時，約有 85% 之母牛可被成功誘導發情；而我國之研究，荷蘭母牛利用兩劑  $\text{PGF}_{2\alpha}$  搭配 GnRH 之發情同期化處理流程，在不進行發情觀察之情況下予以定時人工授精，其受胎率明顯較未處理之對照組，於觀察發情後進行人工授精組者為高 (63.9 vs. 40.8%,  $p < 0.05$ ) (李, 1999)。

有關鹿科動物之發情同期化處理研究方面發現，紅鹿 (Asher *et al.*, 1992b) 或黓鹿 (Asher *et al.*, 1995) 不論單獨使用 CIDR 以及 CIDR 搭配 eCG 或 FSH 處理時，均可獲致極高之誘導發情效率 (70~100%)。於台灣有關鹿科動物之發情同期化處理之研究仍少，尤其台灣水鹿者則尚未被研究；因此於本研究，擬藉由僅利用 CIDR 或搭配 eCG 處理之母鹿發情率與懷孕率，用以評估執行母台灣水鹿發情同期化處理之可行性，期能建立可應用於母台灣水鹿之較佳化發情同期化技術。

家畜精子之冷凍保存，不僅可提供為家畜種原保存之一種方式，亦是一種有效引種或種原交換與交流之手段。推廣及應用此技術，可迅速且廣泛地傳播優良的基因，並促進畜群性能之表現，並提昇育種改良之速率。精液依保存方法可分為液態冷藏保存 (liquid storage of semen) 與冷凍保存 (frozen storage of semen) (Bearden *et al.*, 2004b)。目前某些鹿科動物之精液保存技術雖已建立 (Asher *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2004)，但台灣水鹿精液之冷藏與冷凍研究則尚未被報導，因此本研究擬探討不同稀釋液添加對台灣水鹿精液冷藏保存之影響，以尋得適合於台灣水鹿精液冷藏與冷凍使用之稀釋液種類；並進一步予以人工授精，期能建立台灣水鹿之人工授精技術。

## 材料與方法

### I. 試驗動物來源

本試驗所用之鹿群，係圈養於高雄種畜繁殖場鹿舍 (屏東縣內埔鄉，約 22.5°N)。選用健康性成熟之經產母台灣水鹿 (四至六歲齡) 作為試驗母鹿群，健康性成熟之輸精管結紮公水鹿作為試情公鹿，性成熟高產茸量公水鹿作為配種用或人工授精所需精液來源公鹿。

### II. 試驗期間

由王 (2003) 之研究顯示，母臺灣水鹿之配種季節主要在每年中之 6 至 12 月期間；因此，本研究試驗均於此配種季節進行。

### III. 試驗設計

試驗一：母台灣水鹿經 CIDR 發情同期化處理後之血清中助孕酮濃度變化

將處於配種季節 (8-12 月) 之性成熟母台灣水鹿 12 頭供為本試驗之鹿群，其中 3 頭不經任何處理作為對照組，另 9 頭則予以進行陰道埋植 CIDR 之發情同期化處理。兩處理組母鹿分別於處理之第 0、8 及 12 日之上午 10~12 h 進行採血；採集之血液經遠心分離後分裝凍存。待試驗期之血清

樣品收集完成後，利用 EIA 法測定血清中助孕酮濃度之變化，用以探討母台灣水鹿經 CIDR 發情同期化處理後之血清中助孕酮濃度變化情形，並期能藉以評估 CIDR 應用於母台灣水鹿發情同期化處理之可行性。

#### 試驗二：母台灣水鹿經 CIDR 搭配 eCG 發情同期化處理後之發情效率與懷孕率

將處於配種季節（8-12 月）之性成熟母台灣水鹿 14 頭予以進行陰道埋植 CIDR，並搭配 eCG 之發情同期化處理。經發情同期化處理之母鹿分別利用監視器電腦 24 h 全天候錄影監控其發情狀況，用以評估利用 CIDR 搭配 eCG 之發情同期化處理方法之發情效率。其後將穩定被駕乘之母鹿，於穩定駕乘後之 8~12 h 進行第一次自然配種，並間隔 12 小時後進行複配；完成配種之母鹿於預定發情日前後 4 天（共 8 天），以監視器 24 h 全天候錄影監控其發情狀況，並涵蓋 2 個動情週期，用以評估利用 CIDR 搭配 eCG 之發情同期化處理方法之懷孕率；且以分娩母鹿數評估其分娩率，期能藉以建立母台灣水鹿之發情同期化技術。

#### 試驗三：冷藏稀釋液種類對母台灣水鹿懷孕率及分娩率之影響

將處於配種季節（8-12 月）之性成熟母台灣水鹿 12 頭，予以進行陰道埋植 CIDR 並搭配 eCG 之發情同期化處理。經發情同期化處理之母鹿分別利用監視器 24 h 全天候電腦錄影監控其發情狀況，用以評估利用 CIDR 搭配 eCG 之發情同期化處理方法之發情效率。其後並將穩定被駕乘之母鹿，於穩定駕乘後之 8~12 h，分別以 Tris- 蛋黃或檸檬酸鈉-蛋黃為主成分之稀釋液製備之冷藏精液進行第一次人工授精，並於 12 h 後進行複配；完成授精之母鹿於預定發情日前後 4 天（共 8 天），以監視器 24 h 錄影全天候監控其發情狀況，並涵蓋 2 個動情週期，用以探討冷藏稀釋液種類對母鹿懷孕率之影響；且以分娩母鹿數評估其分娩率，期能藉以建立母台灣水鹿之人工授精技術。

#### IV. 試驗動物之飼養管理

- (i) 場地：試驗鹿群均飼於欄舍面積為  $10 \times 4 \text{ m}^2$ ，簷高 4 m 之鹿舍中，其中 1/2 面積備有遮陰設施。
- (ii) 飼養管理：
  1. 日糧：粗料（盤固拉乾草及苜蓿塊）任食。精料為新化畜產試驗所 15 號料（約含粗蛋白 30%），每頭每日約餵飼 500 g，均分於早、晚各餵飼一次。
  2. 飲水：供應潔淨之飲水任飲之。

#### V. 母鹿之發情同期化處理

將 CIDR (CIDR<sup>®</sup>, AHI Inc. New Zealand) 裝配於專用置入器後，即予以置於母鹿之陰道中 14 天。並以置入之當日視為處理之第 0 日，於第 8 日更新 CIDR；第 14 日取出 CIDR 時，且予以肌肉注射 2 mL 含 250  $\mu\text{g/mL}$  之 PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (cloprostenol, Estrumate<sup>®</sup>, Coopers, Germany)。在 eCG 注射組母鹿，除如上述流程予以 CIDR 處理外，並於第 12 日肌肉注射 250 IU 之 eCG (血清哥娜，中化)；其中僅使用 CIDR 發情同期化處理及未處理之對照組母鹿供血清助孕酮 (progesterone, SP<sub>4</sub>) 濃度變化之評估；而 CIDR 搭配 eCG 之發情同期化處理母鹿則供配種或人工授精之用。

#### VI. 血液樣品採集與血清製備

試驗鹿隻於採血前均以鹿隻專用固定架 (圖 1) 保定之。試驗母鹿於驅趕入固定架後，視鹿隻個體之緊迫反應程度，而決定是否搭配麻醉保定，若需施打麻醉劑時，其施打劑量為每頭每公斤體

重施予 0.02 mL 混合麻醉劑。混合麻醉劑成分為 2% 安耐寧 (Chanazine 0.2%, Xylazine 20 mg/mL, Ireland) 與易眠靜 1000 (Imalgene 1000, Ketamine 100 mg/mL, France), 以 1:1 比例混合之, 並視鹿隻個體之麻醉程度, 酌量增加施打劑量, 直至鎮靜保定為止; 鹿隻保定後即進行採血作業。採血時機為試驗處理之第 0、8 及 12 日之上午 10~12 h, 應用 10 mL 塑膠針筒及 18G 針頭, 自母鹿頸靜脈採血 10 mL。所採集之血液樣品, 均置於 4 °C 冰箱冷藏靜置, 使血液凝固, 並於次晨, 經遠心分離後 (3000 rpm, 4°C, 10 min) 收集其血清; 血清經分裝於 1.5 mL 離心管後, 置於冷凍櫃 (-20°C) 保存, 俾供血清中 SP<sub>4</sub> 濃度之測定。



圖1. 母臺灣水鹿之固定。

Fig. 1. Sambar does was held in the trunk.

#### VII. 血清助孕酮濃度之測定

母台灣水鹿血清中 P<sub>4</sub> 濃度之測定, 係依吳等 (1989) 以微滴盤酵素免疫分析法 (enzyme immunoassay, EIA) 為之。其步驟乃先將凍存於 -20°C 之母台灣水鹿血清解凍後, 以分析緩衝液稀釋約 30 倍, 再吸取 50  $\mu$ L 稀釋樣品及助孕酮標準溶液, 置入經助孕酮抗體吸附之 96 槽微滴盤 (Costar 3590) 中, 隨即加入 150  $\mu$ L SP<sub>4</sub> 與藥草根過氧化酶 (horseradish peroxidase, HRP) 之偶聯體, 在室溫下混勻並進行競爭抗體結合反應 60 min 後, 再以清洗緩衝液 (0.01 M PBS, 含 0.025% tween-20, 0.01% thimerosal; pH=7.2) 沖洗 6 次, 以清除游離態 SP<sub>4</sub>。其後旋即加入 100  $\mu$ L TMB 受質溶液作為呈色基質, 於室溫進行避光呈色反應 20 min。最後以 50  $\mu$ L 0.05 M 之 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 終止反應, 再將微滴盤置於 EIA reader (Automated Microplate Reader EL311s, EIA reader, BIO-TEK), 在 450 nm 波長下測其吸光值, 由外接的微量判讀機利用半對數法計算樣品之 SP<sub>4</sub> 濃度。

#### VIII. 母鹿之發情觀察

經 CIDR 搭配 eCG 發情同期化處理之母鹿於 CIDR 移除後, 即將該等母鹿群每 4-5 頭區分於同一飼養欄舍, 並在每一飼養欄舍均分別放入 1 頭已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。

#### IX. 母台灣水鹿之配種



經 CIDR 搭配 eCG 發情同期化處理之母鹿，在被試情公鹿或同群母鹿穩定駕乘後之 8~12 h，與性成熟公鹿進行第一次配種，並間隔 12 h 後進行複配；完成配種之母鹿每 4-5 頭區分於同一飼養欄舍飼養，靜待懷孕判定。

#### X. 人工授精用精液之製備

在採精前，公鹿以鹿隻專用固定架保定後，在頸靜脈注射麻醉劑麻醉。其後以鹿專用電激採精器分四階段進行採精，電流強度為 1.8 安培，電壓為 3-15 伏特，以逐漸加強電壓之方式進行電激採精。採得之原精液先進行性狀測定，並將活力等級 (sperm motility scale) 評估為 4 級以上之精液 (吳等, 2002)；分別以 Tris- 蛋黃或檸檬酸鈉-蛋黃為主成分之稀釋劑於 37°C 條件下進行稀釋，稀釋比率以精子濃度 1 億/mL 為原則，並於裝置入 0.5 mL 麥管 (總精子數為 5 千萬/劑) 後，置於 4°C 冰箱中，緩速降溫保存備用。

#### XI. 母鹿之人工授精

經 CIDR 搭配 eCG 發情同期化處理之母鹿，在被試情公鹿或同群母鹿穩定駕乘後之 8~12 h，分別以 Tris- 蛋黃或檸檬酸鈉-蛋黃為主成分之稀釋劑製備之冷藏精液進行第一次人工授精，並間隔 12 h 後進行複配。冷藏精液人工授精於 4°C 冰箱取出後，即直接以直腸把握法配合人工授精槍進行。完成授精之母鹿每 4-5 頭區分於同一飼養欄舍飼養，靜待懷孕判定。

#### XII. 母鹿之懷孕判定及分娩

發情母鹿經配種或人工授精後，均於試驗後預定之首次發情日前後 4 天 (共 8 天)，以監視器 24 h 全天候錄影監控其發情狀況，並涵蓋 2 個動情週期 (至少 34 天以上)，未再發情者判定為懷孕；完成懷孕判定之母鹿每 4-5 頭區分於同一飼養欄舍飼養，靜待分娩。

#### XIII. 試驗結果之統計分析

在本試驗中，各處理組母鹿血清中 P<sub>4</sub> 濃度間之差異性，係應用 SPSS 套裝軟體 (吳明隆, 2003) 中之一般線性模式 (General Linear Models) 進行變方分析，並進一步以 Duncan 平均值比較法評估處理間之差異顯著性；不同稀釋液所製備冷藏精液人工授精後之懷孕率與分娩率，則以卡方分析法評估處理間之差異顯著性。

## 結果與討論

#### 試驗一：母台灣水鹿經 CIDR 發情同期化處理後之血清中助孕酮濃度變化

試驗一比較母台灣水鹿經 CIDR 發情同期化處理後之血清中助孕酮濃度變化，其結果示於表 1。埋植 CIDR 之母台灣水鹿，其於埋植前之血清助孕酮濃度為  $1.97 \pm 0.05$  ng/mL，於埋植後之第 8 與第 12 日之血清助孕酮濃度分別為  $8.27 \pm 4.47$  和  $6.15 \pm 1.66$  ng/ml；此等數值均分別顯著地高於相對應時期未埋植組母鹿之血清助孕酮濃度 (第 0 日： $0.50 \pm 0.24$ ；第 8 日： $3.49 \pm 0.39$ ；第 12 日： $2.26 \pm 1.02$  ng/mL)。此結果與 Asher and Smith (1987) 利用 CIDR 進行黠鹿之發情同期化處理試驗所得結果相似，作者認為埋植 CIDR 組母鹿血中具較高助孕酮含量之原因，乃由於 CIDR 所釋出者。此外，此結果也說明源自 CIDR 所釋出之 P<sub>4</sub> 可使母鹿血中助孕酮濃度維持於高值，而使母鹿具有同期化發情之可能性。

表 1. 發情同期化對母台灣水鹿血清中助孕素 (P<sub>4</sub>) 濃度之影響Table 1. The effect of synchronization on the serum progesterone (P<sub>4</sub>) concentration of the Formosan sambar does

Treatment (animal number)	Serum P <sub>4</sub> concentrations, ng/mL		
	d0	d8	D12
Control (3)	0.50 ± 0.24 <sup>aA</sup>	3.49 ± 0.39 <sup>bA</sup>	2.26 ± 1.02 <sup>bA</sup>
CIDR devices alone (9)	1.97 ± 0.05 <sup>aA</sup>	8.27 ± 4.47 <sup>bb</sup>	6.15 ± 1.66 <sup>bb</sup>

\*助孕酮陰道釋放裝置 (CIDR) 置入日為第 0 日，於置入後之第 8 日更新 CIDR。

CIDR device inserted at day 0; CIDR device replaced at day 8.

<sup>a,b</sup> Mean ± SD within rows with different superscripts significantly differ (P < 0.05).<sup>A,B</sup> Mean ± SD within column with different superscripts significantly differ (P < 0.05).

## 試驗二：母台灣水鹿經 CIDR 搭配 eCG 發情同期化處理後之發情效率與懷孕率

試驗二評估利用 CIDR 搭配 eCG 發情同期化處理母台灣水鹿後之發情率與懷孕率 (表 2)，結果顯示在 2004 年所執行之 4 頭母鹿中，4 頭均被誘導發情，其發情率為 100%；而發情母鹿經自然配種後之懷孕率為 75% (3/4)，且此三頭懷孕母鹿均各分娩 1 頭仔鹿，惟其中一頭仔鹿難產死亡，另 2 頭仔鹿則健康存活。於 2005 年則進行 10 頭母台灣水鹿之發情同期化，其誘導成功之發情率為 80% (8/10)；發情母鹿經配種後之懷孕率 (涵蓋 2 個動情週期均未發情者) 為 87.5% (7/8)，且該 7 頭懷孕母鹿均各分娩 1 頭仔鹿，分娩率為 87.5% (7/8)。綜合上述結果顯示，利用 CIDR 搭配 eCG 處理之發情同期化模式具有極高之誘導發情率與懷孕率，其中二次試驗之平均發情率為 85.7% (12/14) 與 Asher *et al.* (1992a) 於紅鹿或 Asher *et al.* (1995) 於黠鹿所進行發情同期化處理者相近似 (70 和 100%)。而二次試驗之懷孕率為 83.3% (10/12)，也與 Liu *et al.* (2002) 試驗結果，自然發情之台灣梅花鹿的懷孕率為 90% (9/10) 者相接近；惟其分娩率 67% (6/9) 則低於本試驗所得之分娩率 (83.3%)。此等結果證實，利用 CIDR 搭配 eCG 之發情同期化處理模式可適用於母台灣水鹿。

表 2. 母台灣水鹿發情同期化處理之發情懷孕與分娩率

Table 2. The estrus pregnancy rate, and parturient rate of estrus synchronized Formosan sambar does after natural mating

Year	n	No. (%) of estrus does	No. (%) of pregnant does	No. (%) of parturient does
2004	4	4 (100.0)	3 (75.0)	3 (75.0)
2005	10	8 (80.0)	7 (87.5)	7 (87.5)
Total	14	12 (85.7)	10 (83.3)	10 (83.3)

\*助孕酮陰道釋放裝置 (CIDR) 置入日為第 0 日，於置入後之第 8 日更新 CIDR，並於置入後之第 12 日注射 250 IU eCG。

\*CIDR device inserted at day 0, CIDR device replaced at day 8, eCG inject at day 12.

### 試驗三：冷藏稀釋液種類對母台灣水鹿懷孕率及分娩率之影響

試驗三擬先建立適合於台灣水鹿精液冷藏與冷凍使用之稀釋液種類，結果顯示於表 3。利用 CIDR 搭配 eCG 發情同期化處理之 12 頭母台灣水鹿，其中 9 頭於 48-60 小時發情，其發情率為 75%。其後 9 頭已發情之母台灣水鹿中之 4 頭，經 Tris- 蛋黃稀釋液所配製之冷藏精液人工授精後，有 3 頭懷孕（未再重發情者），懷孕率為 75%；而該 3 頭懷孕母鹿均各分娩 1 頭仔鹿。另外 5 頭已發情之母台灣水鹿，經檸檬酸鈉-蛋黃稀釋液所配製之冷藏精液人工授精後，均未再呈現發情，懷孕率為 100%；該 5 頭懷孕母鹿亦均各分娩 1 頭仔鹿。上述兩處理組不論在懷孕率（75% vs. 100%）或分娩率（75% vs. 100%）均無顯著性差異，目前兩處理組所分娩之仔鹿均健康成長中。綜合上述結果，利用 Tris- 蛋黃或檸檬酸鈉-蛋黃為基質之稀釋液均適用於台灣水鹿精液之冷藏保存，此結果亦見於王（2002）之研究，顯示台灣水鹿精液經 Tris- 蛋黃與檸檬酸鈉-蛋黃為基質之稀釋液冷藏 3 h 後具相同之存活率（74.7 vs. 75.3%）。在其他鹿種精液冷凍之報告中，也指出鹿科動物精液之適宜稀釋液主要以 Tris 和或 Citrate 為基質之緩衝液（Asher *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2004）。此等稀釋液在精液冷藏過程中之功效可減緩精液於低溫保存過程中之 pH 值的降低，因為在精液於低溫保存過程中，由於精子代謝產物-乳酸的累積，使精液 pH 值降低，而當 pH 值達一定限度後即會影響精液品質，甚至造成精子死亡（Bearden *et al.*, 2004b）。此外，稀釋液中添加蛋黃之目的，主要乃因蛋黃所含的低密度脂蛋白（low density lipoprotein, LDL）、卵磷脂等，可保護精子脂蛋白鞘（lipoprotein sheath），避免冷休克（cold shock）（Kumar *et al.*, 1992），而具有保護精子之功能。近年來，以萃取自蛋黃中之 LDL 取代蛋黃之添加量，其結果顯示添加 5-10% LDL 之處理組的精子活動性較添加蛋黃對照組為佳（Moussa *et al.*, 2002），而証實蛋黃內之主要冷凍保護劑為 LDL。

表 3. 稀釋液種類對母台灣水鹿經冷藏精液人工授精後之懷孕與分娩率之影響

Table 3. Effects of the semen diluents on the pregnant and parturient rate of estrus synchronized Formosan sambar does after artificial inseminated with cooled semen

Diluents	No. of service	No. (%) of pregnancy	No. (%) of parturient does
TY (Tris-Yolk)	4	3 (75.0)	3 (75.0)
CY ( Citrate-Yolk)	5	5 (100.0)	5 (100.0)

另一方面，由於鹿的體型較牛及馬等家畜微小，因此鹿之人工授精多採行羊之模式，其方式不外乎利用腹腔鏡於子宮角注精（Asher *et al.*, 1993）或利用開腔器於子宮頸內（Krzywinski and Jaczewski, 1978; Jabbour *et al.*, 1993）及子宮體內注精（Asher *et al.*, 1990）。惟利用內視鏡於子宮角注精者需配合外科手術進行，故較無商業應用之價值；利用開腔器者需抬高母鹿臀部恐導致麻醉母鹿胃內容物逆流而造成阻礙呼吸。本研究首開以直腸手握法進行台灣水鹿人工授精先例，上述結果顯示，母鹿之懷孕率達 88.9%（8/9）；顯然利用直腸手握法進行台灣水鹿人工授精之策略是可行的；且懷孕率明顯優於國外於紅鹿和黇鹿利用開腔器於子宮頸內注精之 47.3~76.3%（Asher *et al.*, 1992a; Asher *et al.*, 1993; Jabbour *et al.*, 1993）及梅花鹿利用腹腔鏡經由子宮角注精之 50~53.3%（Willard *et al.*, 1996）。造成此等差異之原因迄今未明，惟因利用直腸手握法進行人工授精可同時觸診卵巢之生理狀況，而本研究於進行人工授精時亦發現發情母鹿之卵巢中均具有

排卵前濾泡或剛排卵濾泡，故可明確掌控母鹿之生理週期，此或是本研究有極高懷孕率之主因。此外，在本研究中，母台灣水鹿經人工授精後成功產仔之結果，亦為我國之首例（圖 2）。此等結果顯示，母台灣水鹿之發情同期化及人工授精技術，在本研究已成功建立。



圖2. 發情同期化處理母台灣水鹿經冷藏精液人工授精後成功分娩仔鹿之首例

Fig. 2. The first Sambar fawn born from estrus synchronized does after AI with cooled semen.

## 參考文獻

- 王俊強。2002。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。台中市。
- 李善男。1999。利用定時配種法改善台灣南部泌乳牛之受胎率研究。中畜會誌 28:373-380。
- 吳兩新、王惠玲、方世偉、莊榮輝、章淑珍、黃森源、林仁壽。1989。牛乳中助孕素酵素免疫測定微滴盤法之建立。台灣大學農學院研究報告 29:173-183。
- 吳明隆。2003。SPSS統計應用實務。文魁資訊股份有限公司。台北市。
- 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。
- Asher, G. W. and J. F. Smith. 1987. Induction of oestrus and ovulation in farmed fallow deer (*Dama dama*) by using progesterone and PMSG treatment. *J. Reprod. Fert.* 81:113-118.
- Asher, G. W., D. C. Kraemer, S. J. Magyar, M. Brunner, R. Moewbe and M. Giaquinto. 1990. Intrauterine insemination of farmed fallow deer (*Dama dama*) with frozen thawed semen via laparoscopy. *Theriogenology* 34: 569-577.
- Asher, G. W., M. W. Fidher, H. N. Jabbour, J. F. Smith, R. C. Mulley, C. J. Morrow, F. A. Veldhuizen and M. Langridge. 1992a. Relationship between the onset of oestrus, the preovulatory surge in luteinizing hormone and ovulation following oestrous synchronization and superovulation of farmed red deer (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fertil.* 96:261-273.
- Asher, G. W., C. J. Morrow and H. N. Jabbour. 1992b. Laparoscopic intra-uterine insemination of fallow deer with frozen-thawed or fresh semen after synchronization with CIDR devices. *N. Z. Vet. J.* 40:8-14.



- 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.
- Asher, G. W., M. W. Fisher, D. K. Berg, F. A. Veldhuizen and C. J. Morrow. 1995. Luteolytic potency of a prostaglandin analogue at different stages of the oestrus cycle in red deer (*Carvus elaphus*) hinds. *J. Reprod. Fertil.* 103:307-314.
- Asher, G. W., D. K. Berg and G. Evans. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 195-211.
- Bearden, H. J., J. W. Fuquary and S. T. Willard. 2004a. Mating behavior. In: *Applied Animal Reproduction*. pp. 87-95. Prentice Hall, USA.
- Bearden, H. J., J. W. Fuquary and S. T. Willard. 2004b. Semen processing, storage, and handling. In: *Applied Animal Reproduction*. pp.198-221. Prentice Hall, USA.
- Cheng, F. P., J. T. Wu, Jacky P. W. Chan, J. S. Wang, H. P. Fung, B. Colenbrander and K. C. Tung. 2004. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan sika deer and Formosan sambar deer. *Theriogenology* 61:1605-1616.
- Fortune, J. E., J. Sirois, A. M. Turzillo and M. Lavoie. 1991. Follicle selection in domestic ruminants. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 43: 187-198.
- Jabbour, H. N., F. A. Veldhuizen and G. Green. 1993. Endocrine responses and conception rates in fallow deer (*Dama dama*) following oestrous synchronization and cervical insemination with fresh or frozen-thawed spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 95:495-502.
- Kindahl, H., O. Knudsen and A. Madej. 1982. Progesterone, prostaglandin F-2 $\alpha$ , PMSG and oestrone sulphate during early pregnancy in mare. *J. Reprod. Fertil.* 32:353-359.
- Krzywinski, A. and Z. Jaczewski. 1978. Observations on the artificial breeding of red deer. *Symo. Zool. Soc. London* 43:271-287.
- Kumar, S., K. L. Sahin and G. Mohan. 1992. Effect of different sugar as sole cryoprotectant in freezing of buffalo semen. *Buffalo J.* 8:305-309.
- Larson, L. L. and P. J. H. Ball. 1992. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology* 38: 255-267.
- Liu, B. T., S. P. Cheng and M. C. Huang. 2002. Serum progesterone changes in luteal cyclicality and duration of estrous cycle in Formosan sika deer (*Cervus nippon taiouanus*) hinds. *Zoolog. Sci.* 19:1033-1037.
- Lucy, M. C. and J. S. Stevenson. 1986. Gonadotropin-releasing hormone at estrus: luteinizing hormone, estradiol, and progesterone during the periestrus and postinsemination period in dairy cattle. *Biol. Reprod.* 35: 300-311.
- Moussa, M., V. Martinet, A. Trimeche, D. Tainturier and M. Anton. 2002. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by easy method : Cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57:1695-1706.
- Pursley, J. R., M. O. Mee and M. C. Wiltbank. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PG F $_{2\alpha}$  and GnRH. *Theriogenology* 44: 915-923.
- 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.

# Establishment of estrus synchronization and artificial insemination techniques in Formosan Sambar deer <sup>(1)</sup>

Shann-Ren Kang <sup>(2)</sup> Chih-Hua Wang <sup>(2)</sup> Perng-Chih Shen <sup>(3)</sup>  
and Bing-Tsan Liu <sup>(3)(4)</sup>

Received : Feb. 1, 2008 ; Accepted : Dec. 12, 2008

## Abstract

The aims of this study were to establish the techniques of estrus synchronization and artificial insemination (AI) in Formosan Sambar. The purpose of experiment 1 was to evaluate the change of serum progesterone (P<sub>4</sub>) concentration in the period of Formosan Sambar does estrus synchronized with an intravaginal controlled internal drug releasing (CIDR-type S). The P<sub>4</sub> concentrations of serum derived from CIDR treated does at day 0, day 8 and day 12 were  $1.97 \pm 0.05$ ,  $8.27 \pm 4.47$  and  $6.15 \pm 1.66$  ng/mL, respectively, while the non CIDR-treated does (control group) were  $0.50 \pm 0.24$ ,  $3.49 \pm 0.39$  and  $2.26 \pm 1.02$  ng/mL, respectively. The results indicated that the P<sub>4</sub> concentrations of CIDR treated does were higher than those from the control does ( $P < 0.05$ ) during the tested periods. The purposes of experiment 2 were to determine the estrus rate and pregnant rate of the Formosan Sambar does following estrus synchronized with CIDR plus eCG. The result showed that the estrus rate of estrus synchronized Formosan Sambar does was 85.7% (12/14). Moreover, ten of the twelve estrus does were pregnant after mating with Formosan Sambar stag, and gave birth to 10 kids. The purpose of experiment 3 was to investigate the effect of the semen extenders on the pregnant and parturient rate of estrus synchronized Formosan Sambar does after AI with cooled semen. The result showed that the pregnant rate (75.0 vs. 100.0%) and parturient rate (75.0 vs. 100.0%) of estrus synchronized Formosan Sambar does after AI with cooled semen diluted with Tris-Yolk extender were not significantly different from those does after AI with cooled semen diluted with Citrate-Yolk extender. In conclusion, the estrus rate was 85.7% in Formosan Sambar does estrus synchronized with CIDR plus eCG, and the pregnant rate and parturient rate of estrus synchronized Formosan Sambar does after AI with cooled semen were 88.9%. The respective results of this study showed that the techniques of estrus synchronization and artificial insemination in Formosan Samba were well established.

Key words : Formosan Sambar deer, Serum progesterone concentration, Estrus synchronization, Artificial insemination, Semen extender.

- 
- (1) Contribution No.1500 from Livestock Research Institute (LRI) , Council of Agriculture (COA) .
  - (2) Kaohsiung Animal Propagation Station, COA-LRI, Taiwan, R.O.C.
  - (3) Department of Animal Science, National Pingtung University of Science and Technology, 1 Hsueh Fu Road, Neipu, Pingtung 912, Taiwan, R.O.C.
  - (4) Corresponding author, E-mail: tml19@mail.npust.edu.tw

