

稀釋液對臺灣梅花鹿精液冷凍解凍後性狀之影響⁽¹⁾

林信宏⁽²⁾ 郭廷雍⁽³⁾ 劉雅醇⁽²⁾ 張伸彰⁽²⁾ 楊鎮榮⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：112 年 10 月 20 日；接受日期：113 年 6 月 11 日

摘 要

本研究目的係評估稀釋液種類對臺灣梅花鹿精液冷凍後精液品質之影響。試驗選用健康、性成熟牡臺灣梅花鹿，於 10 月至 12 月以電激方式採集精液樣本進行冷凍，分別利用 Tris 檸檬酸-蛋黃 (Tris-citric acid-yolk, TCY)、Tris hydroxymethyl-2-aminomethane-sulphonic acid- 蛋黃 (TEST-yolk, TY) 與檸檬酸-蛋黃 (citric acid-yolk, CY) 三種稀釋液進行稀釋與冷凍。結果顯示，剛解凍 0 小時 TCY、TY 與 CY 三組之精子活力與前進活力沒有顯著差異，然 TCY 於平均曲線運動速度顯著優於 TY 與 CY 組 ($P < 0.05$)，在平均直線運動速度、運動前向性與運動直線性，CY 則顯著優於 TCY 組 ($P < 0.05$)。精液於解凍及培養後進行評估，解凍後 1 小時各組的精子活力與前進活力沒有顯著差異，然在移動參數評估方面，CY 組之平均直線運動速度、運動前向性及運動直線性均顯著優於 TCY 組 ($P < 0.05$)；解凍後 2 小時 CY 組的前進活力優於 TCY 組 ($P < 0.05$)，其餘性狀則各組間無顯著差異。試驗母鹿均經發情同期化處理，於 CIDR[®] 移除後 60 小時進行 CY 組冷凍解凍精液之人工授精，結果顯示，所有鹿隻整體受胎率為 7.1% (1/14)。試驗結果顯示，臺灣梅花鹿精液應用 CY 稀釋液進行冷凍可得較佳之解凍後活力與精子運動參數。

關鍵詞：臺灣梅花鹿、稀釋液、精液性狀。

緒 言

在鹿科動物方面已經應用許多精液冷凍保存技術，但在保護稀釋液和冷凍方法的發展落後其它家畜反芻動物，大部分成功應用在鹿的稀釋液主要是從小型反芻動物發展而來的糖基三羥甲基氨基甲烷 (sugar-based Tris) 和 / 或檸檬酸鹽緩衝液 (citrate buffer solution)，以及使用蛋黃防止冷休克和甘油作為冷凍保護劑 (Salamon and Maxwell, 1995)。精液稀釋液功能為保護精子避免冷凍解凍過程所造成之傷害，維持精子適合之滲透壓與 pH 值，以及提供精子代謝所需之能量 (Medeiros *et al.*, 2002)。一般用於冷凍稀釋液之基本成分應包括離子及非離子之緩衝物質如三羥甲基氨基甲烷 (Tris (hydroxymethyl) aminomethane; Tris) 及三羥甲基-2-氨基甲磺酸 (Tris hydroxymethyl-2-aminomethane-sulphonic acid; Test) 等，以維持精子滲透壓及 pH 值平衡，非滲透性脂蛋白或高分子量物質如蛋黃或脫脂乳，可防止精子冷休克，再則具滲透性之抗凍劑如甘油、丙二醇或雙甲基磺氧化物 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 可提供精子抗凍保護，而提供精子能量來源之醣類如葡萄糖或果糖亦極為重要，其他添加物如抗生素及抗氧化劑亦會影響解凍後之精子受精率 (Vishwanath and Shannon, 2000)。稀釋液之 pH 值範圍介於 6.75 到 7 之間，一般哺乳動物精液 pH 介於 7.2 到 7.8 之間。乳糖、蔗糖、棉子糖、海藻糖和葡萄糖聚糖無法擴散進入細胞膜內，但是可以創造出低滲透壓的環境，促使細胞脫水並降低細胞內冰晶形成的機會，這些醣類與磷脂質在細胞膜產生交互影響，增加了冷凍精子存活機率。

家畜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 pressure) 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，甚至造成精子死亡。若欲完全抑制精子之代謝作用，則其保存溫度須低於 -130°C 始可達成。與精液等張

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2794 號。
(2) 農業部畜產試驗所南區分所。
(3) 農業部畜產試驗所遺傳生理組。
(4) 通訊作者，E-mail: jryang@mail.tlri.gov.tw。

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)、檸檬酸鹽緩衝液與三羥甲基氨基甲烷緩衝溶液 (Bearden *et al.*, 2004)。兩種常使用在鹿科動物精液冷凍時之稀釋液為檸檬酸鈉－蛋黃－甘油 (sodium citrate-egg yolk-glycerol) 和三羥甲基氨基甲烷－葡萄糖－檸檬酸－蛋黃－甘油 (Tris-glucose-citrate-egg yolk-glycero) (Asher *et al.*, 2000)。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。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。

然而，生性敏感不易操作的臺灣梅花鹿於繁殖上亦面臨晚熟、繁殖季節可採精時期短、採精需鎮靜及採精後需 2 週以上之緊迫舒緩等問題，故迄今針對臺灣梅花鹿精液冷凍保存之研究甚少。本研究之目的在於評估不同稀釋液對冷凍後精液品質影響之探討，期尋得適當之稀釋液，建立較佳之冷凍保存稀釋液以應用於人工授精，提高優良種鹿之繁殖效率。

材料與方法

I. 試驗動物與試驗處理

選用飼養於南區分所屏東場區之健康且性成熟之牡臺灣梅花鹿 6 頭，試驗進行依照南區分所屏東場區實驗動物照護及使用委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee) 審定之規定 (KAPS IACUC, No. 110-16)。每日提供盤固拉乾草、玉米青貯及苜蓿草塊等粗料與清潔飲水，另每頭鹿隻每日補充 500 g 精料。試驗於 10 月至 12 月進行，參試公鹿自 9 月開始進行電激採精。

II. 精液採集

牡臺灣梅花鹿於採精進行前 24 小時先予斷水斷食，採精時以 10% 安耐寧 S (Balanzine; Xylazine 10%, 100 mg/mL, 臺灣) 與舒泰 50 (Zoletil 50; Tiletamine base, 25 mg/mL and Zolazepam base, 25 mg/mL, France) 調配成 1:2 比例混合之麻醉劑，每頭肌肉注射 3 mL，同時肌肉注射 1 mL 阿托品。鎮靜保定後，再以電激採精器 (Electroejaculator, EJ6CCGS, CGS Products Pty Ltd., Australia)，每次以 2 V 之固定電壓持續刺激 20 秒，停止刺激 8 秒，共循環三次，進行電激採精牡鹿精液，待精液流出後以 15 mL 之離心管收集精液樣本，經檢查活力評級為 4 級以上、存活率 70% 以上之新鮮精液作為稀釋液添加測試分組來源，供精液冷凍保存及後續試驗使用。

III. 精液之冷凍保存性狀評估

本試驗中之精液稀釋液配方，包括 Tris-檸檬酸－蛋黃 (Tris-citric acid-yolk, TCY)、Tris hydroxymethyl-2-aminomethane-sulphonic acid-蛋黃 (TEST-yolk, TY) 或檸檬酸－蛋黃 (citric acid-yolk, CY) 等 3 種為主成分之稀釋液，所述之成分如表 1 所示。前述稀釋液配方中之蛋黃為配製當天由場內蛋雞舍新鮮生產雞蛋供應。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、存活率 70% 與精液濃度為 10×10^8 個精子/mL 以上之精液，先添加 1:1 不含抗凍劑之 TCY、TY 或 CY 為主成分之稀釋液後，隨即隔水置於室溫水中 30 分鐘，待溫度平衡後緩慢添加冷凍稀釋液，隔水放置在冰箱中冷卻 1 hr 以上，使精液緩慢降溫至 4°C。精液達 4°C 後即進行第二階段稀釋，以含有 12% 甘油之預冷至 4°C 之冷凍稀釋液進行 1:1 稀釋，以達到最終為 6% 甘油濃度，最終要求精子濃度為 1×10^8 個精子/mL，添加抗凍劑稀釋液之後，平衡 1.5 小時以上，然後裝入 0.5 mL 麥管中。將麥管置放於液態氮面上方 4 cm 平衡 5 分鐘，隨即投入 -196°C 液態氮桶中保存。

IV. 冷凍精液性狀評估

利用電腦輔助精子分析系統 (computer-aided sperm analysis, CASA) 以及 CEROS II Animal 軟體程序 (Hamilton Thorne Biosciences, Inc, Beverly, USA) 進行評估精子活力 (motility, %)、前進活力 (progressive motility, %)、平均路徑速度 (average path velocity, VAP, $\mu\text{m/s}$)、平均直線運動速度 (straight line velocity, VSL, $\mu\text{m/s}$)、平均曲線運動速度 (curvilinear velocity, VCL, $\mu\text{m/s}$)、運動前向性 (sperm track straightness, STR, $\text{STR} = \text{VSL} / \text{VAP} \times 100$; %)、運動直線性 (linearity index, LIN, $\text{LIN} = \text{VSL} / \text{VCL} \times 100$; %)。將於液態氮桶中保存一週以上之冷凍精液解凍後，取 2.3 μL 精液濃度 25×10^6 個精子/mL 注入至 Leja 玻片 (Leja[®] cell, IMV, Aigle, France) 上，並置於顯微鏡專用加溫板上，維持 37°C 恆溫 10 min 後，於 200 倍率下，隨機選取 5 個視野進行軟體分析。解凍後之精液持續置於 37°C 培養箱中，待經 1、2 小時培養後利用 CASA 進行精液檢測評估。

表 1. Tris- 檸檬酸 - 蛋黃 (TCY)、TEST- 蛋黃 (TY) 與檸檬酸 - 蛋黃 (CY) 稀釋液之配方

Table 1. The composition of TCY, TY and CY extenders

Components	TCY*	TY	CY
Egg yolk, %	20.0	20.0	20.0
Tris, g	2.7	0.2	—
TES, g	—	1.2	—
Citric acid, g	1.4	—	—
Sodium citrate, g	—	—	2.2
Fructose, g	1.0	1.6	1.0
Glucose, g	—	1.6	—
Gentamicin, µg	250.0	250.0	250.0
Penicillin, µg	150.0	150.0	150.0
Total, mL	100.0	100.0	100.0
Reference	Fernández-Santos <i>et al.</i> , 2006	Pontbriand <i>et al.</i> , 1989	Garde <i>et al.</i> , 2003

* TCY: Tris-citric-base medium; TY: TES-base medium; CY: Sodium citrate-base.

V. 發情同期化處理與人工授精

母鹿之發情同期化處理，即將母鹿以鹿隻專用固定架保定後，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)，於第 10 日肌肉注射含 150 IU 之馬絨毛膜激性腺素 (equine chorionic gonadotropin, eCG, PROSPEC, Israel)，第 12 日移除 CIDR®，並同時肌肉注射 1 mL 含 125 µg/mL 之 PGF_{2α} (Estrumate®, MSD, Germany)。在 CIDR® 移除後 60 h，利用前述冷凍精液性狀評估較佳稀釋液製備之冷凍精液，以每劑 5×10^7 個精子 / 經 37°C 解凍 30 s 後進行傳統人工授精，即將人工授精槍伸入以開腔器張開之陰道對準子宮頸口，使授精槍前端到達子宮體的位置，然後將精液緩慢注入子宮體的位置。部分母鹿則在 CIDR® 移除後 63 h 則進行腹腔鏡人工授精，進行前 24 h 予以斷水斷食，母鹿鎮靜保定後再將之移往鹿隻腹腔鏡人工授精架保定。於操作區域以優碘藥水進行清洗消毒後，接著皮下注射 20 mg/mL 之利都卡因 (Lidocaine) 2 – 3 mL。等待約 5 分鐘後以手術刀於距左右乳頭前 3 – 5 公分處各將皮膚劃開 1 cm，續以腹膜穿刺器 (trocar) 刺穿腹膜；完成穿刺後將 trocar 抽出，將套管留於腹腔；兩側之孔一側置入影像及光源系統，另一側則為腹腔鏡精液注射管進入孔。精液 (0.5 mL； 5×10^7 個精子) 經解凍後於子宮角中段注入精液。傷口縫合後，以優碘藥水噴灑傷口並肌肉注射 8 mL 抗生素；試驗完成之鹿隻先集中於復原欄，復原後另行移動至正常欄位飼養，並於授精後第 45 日後，以超音波掃描儀 (Aloka, Prosound-2, Japan) 配合經直腸型探頭 (Transrectum electronic linear probe, UTS-660, 7.5 MHz, Japan)，透過掃描其子宮腔內宮阜之影像診斷懷孕之確認。

VI. 統計分析

試驗資料以統計分析系統 (Statistical Analysis System; SAS, 2005) 套裝軟體進行統計分析，使用一般線性模式程序 (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

臺灣梅花鹿為特有亞種，係季節性繁殖明顯之鹿種，主要繁殖期每年僅有 10 月至 12 月之繁殖月份。由於鹿科動物生性敏感不易操作，馴化程度不足，不易以假陰道進行採精訓練，且牡臺灣梅花鹿之電激採精、精液稀釋液、精液冷凍與人工授精技術尚未普及化，直接影響到優良種鹿繁殖推廣效率。是故本試驗乃評估稀釋液種類對臺灣梅花鹿精液冷凍後品質之影響，將供試之性成熟臺灣梅花鹿，於麻醉保定後，以電激採精方式進行精液收集以應用於冷凍實驗，採集之新鮮精液各性狀平均數據為精子活力 4.0 ± 1.2 、精子畸形率 $12.9 \pm 5.1\%$ 與精子存活率 $76.3 \pm 19.3\%$ 。

應用 TCY、TY 或 CY 稀釋液添加 6% 甘油作為冷凍保護劑，進行精液冷凍保存後對精子性狀之影響，TCY、

TY 與 CY 三組解凍後 0 小時之結果如表 2 所示，Motility 分別為 55.4 ± 17.3 、 43.0 ± 21.7 、 $49.5 \pm 21.5\%$ ，Progressive motility 則分別為 38.8 ± 15.5 、 35.3 ± 22.3 、 $41.4 \pm 18.9\%$ ，各組間沒有顯著差異 ($P > 0.05$)；但在 VCL 方面，TCY 組為 $126.4 \pm 20.4 \mu\text{m/s}$ ，顯著高於 TY 組 $96.4 \pm 24.8 \mu\text{m/s}$ 與 CY 組 $109.7 \pm 15.9 \mu\text{m/s}$ ($P < 0.05$)；就 VAP 與 VSL 兩方面而言，CY 組分別為 92.7 ± 12.9 和 $82.2 \pm 12.6 \mu\text{m/s}$ ，顯著高於 TY 組之 79.5 ± 20.9 和 $67.5 \pm 18.8 \mu\text{m/s}$ ($P < 0.05$)；在 STR 與 LIN 而言，TCY 組分別為 70.4 ± 5.9 和 $47.4 \pm 4.9\%$ ，顯著低於 TY 組的 82.3 ± 7.6 與 $70.0 \pm 8.3\%$ ，以及 CY 組的 85.4 ± 6.1 與 $73.6 \pm 8.6\%$ ($P < 0.05$)。解凍 1 小時後之結果如表 3 所示，TCY、TY 與 CY 三組在 Motility、Progressive motility、VCL 與 VAP 方面，各組間沒有顯著差異；在 VSL 方面，CY 組為 $60.7 \pm 19.2 \mu\text{m/s}$ ，顯著高於 TCY 組之 $49.3 \pm 18.7 \mu\text{m/s}$ ($P < 0.05$)；但在 STR 與 LIN，CY 組分別為 80.3 ± 8.1 和 $58.9 \pm 12.1\%$ ，亦顯著高於 TCY 組之 69.6 ± 11.0 與 $48.0 \pm 9.5\%$ ($P < 0.05$)。解凍 2 小時後之結果如表 4 所示，TCY、TY 與 CY 三組在 Motility、VCL、VAP、VSL、STR 與 LIN 方面，各組間沒有顯著差異 ($P > 0.05$)，僅在 Progressive motility 方面，CY 組之 $9.0 \pm 11.4\%$ 顯著高於 TCY 組之 $2.8 \pm 3.5\%$ ($P < 0.05$)。CY 組於解凍後 2 小時之 Motility 與 Progressive motility 有相對較佳之趨勢，相似之結果亦曾在 Cheng *et al.* (2004) 之研究中証實，而該研究顯示梅花鹿精液以 TY 為稀釋液所冷凍之精子存活率優於 TCY 與 CY 稀釋液。

表 2. 不同稀釋液種類對臺灣梅花鹿精液冷凍解凍後 0 小時活力及移動參數之影響

Table 2. Effects of extenders on semen characteristics of Formosan sika deer 0 hr after frozen and thawed

Items	TCY* (n = 16)	TY (n = 16)	CY (n = 16)
Motility, %	$55.4 \pm 17.3^{\#}$	43.0 ± 21.7	49.5 ± 21.5
Progressive motility, %	38.8 ± 15.5	35.3 ± 22.3	41.4 ± 18.9
VCL, $\mu\text{m/s}$	126.4 ± 20.4^a	96.4 ± 24.8^b	109.7 ± 15.9^b
VAP, $\mu\text{m/s}$	$82.5 \pm 16.4^{a,b}$	79.5 ± 20.9^b	92.7 ± 12.9^a
VSL, $\mu\text{m/s}$	59.6 ± 13.6^b	67.5 ± 18.8^b	82.2 ± 12.6^a
STR, %	70.4 ± 5.9^b	82.3 ± 7.6^a	85.4 ± 6.1^a
LIN, %	47.4 ± 4.9^b	70.0 ± 8.3^a	73.6 ± 8.6^a

[#] Mean \pm SD.

* TCY: Tris-citric acid-yolk extender; TY: TEST-yolk extender; CY: citric acid-yolk extender; VCL: curvilinear velocity; VAP: average path velocity; VSL: straight line velocity; STR: sperm track straightness; LIN: linearity index.

^{a,b} Means with different superscripts within same row are significantly different ($P < 0.05$).

表 3. 不同稀釋液種類對臺灣梅花鹿精液冷凍解凍後 1 小時活力及移動參數之影響

Table 3. Effects of extenders on semen characteristics of Formosan sika deer 1 hr after frozen and thawed

Items	TCY* (n = 16)	TY (n = 16)	CY (n = 16)
Motility, %	16.2 ± 10.9	18.6 ± 17.4	26.4 ± 20.5
Progressive motility, %	10.8 ± 9.6	12.8 ± 14.4	20.0 ± 16.5
VCL, $\mu\text{m/s}$	96.8 ± 26.5	83.6 ± 40.3	97.1 ± 27.0
VAP, $\mu\text{m/s}$	64.3 ± 21.3	56.5 ± 30.9	70.0 ± 21.5
VSL, $\mu\text{m/s}$	49.3 ± 18.7^b	$45.0 \pm 23.6^{a,b}$	60.7 ± 19.2^a
STR, %	69.6 ± 11.0^b	$66.9 \pm 20.3^{a,b}$	80.3 ± 8.1^a
LIN, %	48.0 ± 9.5^b	46.2 ± 14.2^b	58.9 ± 12.1^a

Mean \pm SD.

* TCY: Tris-citric acid-yolk extender; TY: TEST-yolk extender; CY: citric acid-yolk extender; VCL: curvilinear velocity; VAP: average path velocity; VSL: straight line velocity; STR: sperm track straightness; LIN: linearity index.

^{a,b} Means with different superscripts within same row are significantly different ($P < 0.05$).

精子之運動性是與精液受精能力相關的最重要參數之一，因此被認為是在雌性生殖道中精子運輸和受精的必要條件 (Verstegen *et al.*, 2002)。在本研究利用 CASA 分析三種稀釋液之精子活力及精子運動參數中，剛解凍時三種稀釋液在精子活力與前進活力上無顯著差異，但在其他的精子運動參數，略有不同。解凍 1 小時後，各組精子活力與

前進活力呈均顯著大幅下降；在 VSL、STR 及 LIN 僅 CY 組顯著高於其他組別。解凍 2 小時後，各組在各項精子活力及精子運動參數中均下降至無顯著差異，僅在前進活力上 CY 組優於 TCY 組。研究顯示，受精率與 VSL 及 VAP 運動參數呈現正相關，在人類精子品質之研究中也發現 VSL 值與生育能力呈正相關 (Wainer *et al.*, 1996)；而 VAP、VCL 及 VSL 等表示精子運動能力越高則數值越高 (Larsen *et al.*, 2000)。

表 4. 不同稀釋液種類對臺灣梅花鹿精液冷凍解凍後 2 小時活力及移動參數之影響

Table 4. Effects of extenders on the semen characteristics of Formosan sika deer 2 hrs after frozen and thawed

Items	TCY* (n = 16)	TY (n = 16)	CY (n = 16)
Motility, %	6.3 ± 5.2	7.4 ± 6.7	12.0 ± 13.1
Progressive motility, %	2.8 ± 3.5 ^b	4.6 ± 5.9 ^{a,b}	9.0 ± 11.4 ^a
VCL, μm/s	62.4 ± 20.5	64.0 ± 39.3	66.0 ± 35.9
VAP, μm/s	36.7 ± 15.2	42.4 ± 26.9	47.4 ± 28.1
VSL, μm/s	27.8 ± 15.2	33.8 ± 22.8	40.7 ± 24.8
STR, %	64.5 ± 17.6	57.7 ± 28.4	64.6 ± 27.2
LIN, %	39.4 ± 14.1	40.1 ± 21.1	47.5 ± 21.9

Mean ± SD.

* TCY: Tris-citric acid-yolk extender; TY: TEST-yolk extender; CY: citric acid-yolk extender; VCL: curvilinear velocity; VAP: average path velocity; VSL: straight line velocity; STR: sperm track straightness; LIN: linearity index.

^{a,b} Means with different superscripts within same row are significantly different ($P < 0.05$).

精液性狀檢查為評估生育力重要指標之一，然評斷冷凍精液之最可信方式是直接進行人工授精，再觀察是否成功懷孕。因此試驗使用前述製備經解凍評估較佳之 CY 組冷凍精液進行人工授精，以探討解凍後對懷孕率之影響，其結果如表 5 所示。結果顯示傳統人工授精全部鹿隻之整體平均受胎率為 7.1% (1/14)，且順利產下 1 頭母仔鹿。但利用腹腔鏡進行人工授精受胎率為 0.0% (0/3)。Gao *et al.* (2009) 研究中，建議於 CIDR 移除後第 58 至 66 小時進行梅花鹿之人工授精，於本研究結果顯示 CIDR[®] 移除後第 60 小時進行人工授精可得到 1 頭母鹿懷孕。發情同期化技術以及隨後的發情觀察是人工授精的重要技術環節之一，但因鹿生性敏感不易觀察，遂利用腹腔鏡進行卵巢濾泡觀察，本試驗中發情同期化處理使用 eCG 之模式，且於 CIDR 拔除後 63 小時利用腹腔鏡觀察卵巢上之濾泡發育情形，可誘導高達 100.0% (3/3) 母鹿卵巢濾泡發育，有利於進一步進行人工授精。但本研究中人工授精後懷孕率甚低，間接推測主要原因可能前述表 3 中 CY 組於體外解凍 1 小時後之檢測結果相關，顯現出 Motility 與 Progressive motility 大幅下降至 26.4 與 20.0%。在家畜生殖中，精子的體外生存時間對於判斷人工授精後，其於子宮腔內妊娠率之表現具有重要的臨床價值。因此，只要能夠提高冷凍解凍後精子的運動能力與延長精子的生存時間，就有利於精子在輸卵管內的受精率。Luis *et al.* (2012) 研究顯示冷凍稀釋液中添加抗氧化劑，有助於提高紅鹿精子解凍後運動能力，並減少冷凍所致精子之損害。將人工授精應用在鹿科動物常受限於：(1) 對物種特有的繁殖特性不了解；(2) 無法將操作緊迫降到最低；(3) 懷孕損失。時至今日，人工授精雖已經發展成熟到可供家畜使用，目前更進一步應用於鹿產業。惟因鹿科動物生性敏感不易操作，因此限制其發展。且很少有大量個體數目進行試驗，以評估這些因子的影響，尤其在使用冷凍精液進行人工授精時，這也是以往國內臺灣梅花鹿甚少成功案例的原因。

綜合前述結果，顯示本試驗已初步建立臺灣梅花鹿精液可應用 TCY、TY 與 CY 三組稀釋液進行冷凍保存，但可看出 CY 組於解凍後 2 小時之精子活力與向前精子活力有相對較佳之趨勢，可提供作為臺灣梅花鹿進行精液冷凍之參考，而日後亦需尋求提升冷凍精液品質之方法及人工授精成功率之技術。

表 5. 不同授精方式對臺灣梅花鹿人工授精後受胎率之影響

Table 5. Effects of different artificial insemination methods on the conception rate of Formosan sika deer

Artificial Insemination (AI)	No. of service	No. of pregnancy (%)
Traditional AI	14	1 (7.1) ⁽¹⁾
Laparoscope AI	3	0 (0.0) ⁽²⁾

⁽¹⁾ 60 hours after CIDR[®] removal.

⁽²⁾ 63 hours after CIDR[®] removal.

參考文獻

- 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. and J. W. Fuquay. 2004. *Applied Animal Reproduction*. 6th Eds. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA. pp. 64-253.
- Cheng, 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.
- Fernández-Santos M. R., M. C. Esteso, V. Montoro, A. J. Soler, and J. J. Garde. 2006. Influence of various permeating cryoprotectants on freezability of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa: Effect of concentration and temperature of addition. *J. Androl.* 69: 1-36.
- Gao, Q. H., H. J. Wei, J. Luo, C. M. Han, S. Schoenian, H. Z. Du, Q. S. Lu, and J. Qian. 2009. Flow cytometric sexing of X- and Y-chromosome-bearing sperm in Sika deer (*Cervus nippon*). *Small Rumin. Res.* 81: 100-104.
- 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 mhor*, and *G. dorcas neglecta*). *Biol. Reprod.* 69: 602-611.
- Larsen, L., T. Scheike, T. K. Jensen, J. P. Bonde, E. Ernst, N. H. Hjollund, and A. Giwercman. 2000. Computer assisted semen analysis parameters as predictor for fertility of men from the general population. *Human Reprod.* 15: 1562-1567.
- Luis, A. L., A. R. Manuel, G. A. Olga, A. Mercedes, M. M. Alejandro, A. Luis, D. P. Paulino, and M. P. Felipe. 2012. Reduced glutathione and Trolox (vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 135: 37-46.
- Medeiros, C., F. Forell, A. Oliveira, and J. Rodrigues. 2002. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it 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. U.K. pp. 751-778.
- Pontbriand D., J. G. Howard, M. C. Schiewe, L. D. Stuart, and D. E. Wiedt. 1989. Effect of cryoprotective diluent and method of freeze-thawing on survival and acrosomal integrity of ram spermatozoa. *Cryobiology* 26: 341-354.
- SAS Institute. 2005. *SAS/STAT Guide for personal computers*. 9.1th ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Salamon, S. and W. M. C. Maxwell. 1995. Frozen storage of ram semen: I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 37: 185-249.
- 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.
- Vishwanath, R. and P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 23-53.
- Verstegen, J., M. Iguer-Ouada, and K. Onclin. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57: 149-179.
- Wainer, R., F. Merlet, M. Bailly, R. Lombroso, E. Camus, and J. P. Bisson. 1996. Prognostic sperm factors in intra-uterine insemination with partner's sperm. *Contracept. Fertil. Sex.* 24: 897-903.

Effects of extenders on thawed semen characteristics of Formosan sika deer after freezing⁽¹⁾

Hsin-Hung Lin⁽²⁾ Ting-Yung Kuo⁽³⁾ Ya-Chun Liu⁽²⁾
Shen-Chang Chang⁽²⁾ and Jenn-Rong Yang⁽³⁾⁽⁴⁾

Received: Oct. 20, 2023; Accepted: Jun. 11, 2024

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effects of extenders on the semen characteristics of Formosan sika deer after freezing. Healthy and sexually matured male Formosa sika deer were selected for the experiment and the semen collection was conducted by electro-ejaculation between October and December. The semen was diluted with three extenders, including Tris-citric acid-yolk (TCY), Tris hydroxymethyl-2-aminomethane-sulphonic acid-yolk (TEST-yolk; TY) and citric acid-yolk (CY), and then frozen. The results showed that wehre was no significant difference in the sperm motility and progressive motility among the TCY, TY and CY groups. However, the VCL (curvilinear velocity) of TCY group was significantly better than that of TY and CY groups ($P < 0.05$), and the VSL (straight line velocity), STR (sperm track straightness) and LIN (linearity index) of CY group was significantly better than those of TCY group ($P < 0.05$). After thawing, the semen was evaluated after thawing and cultivation. There was no significant difference in the sperm motility and progressive motility in 1 hour after thawing. Nonetheless, in terms of the evaluation of progressive parameters, the However, the VSL, STR and LIN of CY group were significantly better than those of TCY group ($P < 0.05$). The progressive motility of the CY group was significantly better than that of the TCY group in 2 hours after thawing ($P < 0.05$), and no significant difference was found in the other characteristics among the TCY, TY and CY groups. The doe of the experiment underwent estrus synchronization and performed artificial insemination using semen from CY group after freezing and thawing semen, in 60 hours after CIDR[®] removal. The results showed that the overall conception rate of all deer was 7.1% (1/14). In conclusion, freezing the semen of Formosan sika deer with CY extender can yield a better motility and progressive characteristics of semen after thawing.

Key words: Formosan sika deer, Extender, Semen characteristics.

(1) Contribution No. 2794 from Taiwan Livestock Research Institute (TLRI), Ministry of Agriculture (MOA).

(2) Southern Region Branch, MOA-TLRI, Pingtung 94644, Taiwan, R. O. C.

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

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