

稀釋液對紅麋鹿精液冷凍—解凍後精液品質之影響⁽¹⁾

林信宏⁽²⁾ 劉雅醇⁽²⁾ 康定傑⁽²⁾ 曾楷扉⁽²⁾ 郭廷雍⁽³⁾ 楊鎮榮⁽³⁾⁽⁴⁾

收件日期：114 年 10 月 31 日；接受日期：115 年 2 月 23 日

摘 要

本研究目的係評估稀釋液種類對紅麋鹿精液冷凍—解凍後精液品質之影響。試驗選用健康及性成熟公紅麋鹿，於 10 至 12 月以電激方式採集精液樣本，並分別利用 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。試驗結果顯示，精液冷凍前之平均精液量 1.5 ± 0.7 mL、精子活力 4.4 ± 0.7 、精子濃度 $18.5 \pm 9.9 \times 10^8$ 精子數/mL、精子畸形率 $11.4 \pm 1.7\%$ 與精子存活率 $77.9 \pm 5.5\%$ 。精液於解凍及培養後進行評估，僅於解凍後 1 小時 TCY 組之前進活力顯著優於 TY 組 ($P < 0.05$)。試驗母鹿均經發情同期化處理，分別於 CIDR[®] (controlled internal drug release) 移除後 56、58、60 或 62 小時進行 TCY 組冷凍解凍精液之人工授精，在 CIDR[®] 移除後第 58 小時進行人工授精之懷孕率為 57.9% (11/19)，明顯高於 60 與 62 時距 ($P < 0.05$)，所有鹿隻整體懷孕率為 42.5% (54/127)。綜上所述，紅麋鹿精液應用 TCY 稀釋液進行冷凍可得較佳之解凍後前進活力，且於 CIDR[®] 移除後第 58 小時進行人工授精可獲得較佳懷孕率。

關鍵詞：紅麋鹿、精液冷凍、人工授精。

緒 言

鹿科動物具有複雜的分類族群，在形態學、生理學、生態學及地理分布上表現出極端的多樣性。繁殖策略依據物種的不同也區分為很多種，範圍包括從很強的季節性到完全非季節性出生模式都有。回顧鹿科繁殖技術的發展，資訊有限且只能用在少數物種上 (Asher *et al.*, 2000)。國內養鹿產業三十多年前由美國進口麋鹿 (Elk) 至臺灣，之後由紐西蘭引進紅鹿 (Red deer)。國內鹿農為發揮雜交優勢常以紅鹿與麋鹿雜交以提高產茸量，且未保留純種紅鹿與麋鹿種原，因此目前都以紅麋鹿稱之。紅鹿與麋鹿均是大型鹿種，成年公鹿體重可達 318 至 363 公斤 (Dean *et al.*, 1976)，這兩種棲息在溫帶地區的鹿種都是季節性生殖的動物，大多在秋天到早春之間配種，越寒冷的地方配種時間越集中。紅麋鹿在臺灣已適應仍維持其原來的季節性生殖，且為季節性繁殖極為明顯的鹿科動物，母鹿在隔年春夏之交分娩，公鹿於立春時解角長茸，其生殖活動之所以具有明顯的季節性，主要是受光照調節，繁殖季節集中在 9 月底至 11 月底。國內繁殖最大問題在於成熟種公鹿攻擊性甚強，且與母鹿體重差異過大，常造成極大之配種損失。

源自溫帶地區呈現出高度季節性繁殖模式之紅鹿與麋鹿，其配種行為發生的時間，亦明顯受緯度高低影響，緯度高者其配種季節愈早，但其配種季節之持續時間則愈短 (Suzuki, 1993)，這對於配子採集及人工授精應用均構成重大限制。雄性鹿種呈現生殖期和不育期交替的現象與睪丸大小及產精功能的變化有關 (Asher *et al.*, 1987; 1996)，此現象反應在精液特徵於驟然的季節性變化中，在春季和夏季鹿茸時期精液完全沒有精子，從而發生精子生成缺乏症，屬於「季節性、生理性、可逆的精子生成抑制」，不等同於臨床或病理定義的無精症 (azoospermia)，嚴重限制採集精液的機會，通常必須在進入生殖季節後立刻或這段時間當中進行收集，而這段期間雄鹿具強烈攻擊性，造成採集精液之困難度。此外季節性限制是與人工授精時機促使最佳化受孕率有關，溫帶雌性物種在春季和夏季出現明顯的乏情期，且直到秋天開始發情前，普遍對發情同期化處理不會有排卵反應 (Morrow *et al.*, 1992)。因此，大部分的人工授精只在繁殖季節中或後期執行 (Asher *et al.*, 1993)。

(1) 農業部畜產試驗所研究報告第 2850 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。

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，而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丙三醇 (glycerol, 俗稱甘油)、丙二醇 (propylene glycol, PG) 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 (Vishwanath and Shannon, 2000)。

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-glycerol) (Asher *et al.*, 2000)。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-buffered)，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)。林等 (2025) 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) 三種稀釋液進行臺灣梅花鹿精液冷凍，結果顯示應用 CY 稀釋液可得較佳之解凍後活力與精子運動參數。同樣利用前述三種稀釋液進行臺灣水鹿之精液冷藏評估，則應用 TY 稀釋液可得較佳之精液品質 (王等, 2010)。

由於攻擊性甚強不易操作的大型鹿種紅麋鹿，於繁殖上面臨晚熟、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，故迄今針對國內紅麋鹿精液冷凍保存與應用之研究甚少，亦無相關研究報告發表。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與大幅減少配種母鹿損失。

材料與方法

I. 試驗動物與試驗處理

選用飼養於苗栗地區民間鹿場 5—10 歲之健康且性成熟之公紅麋鹿 7 頭，試驗進行依照農業部畜產試驗所南區分所實驗動物照護及使用委員會 (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) 審定之規定 (KAPS IACUC, No. 110-16)。試驗於 2021 年 9 月底至 11 月期間進行，每日提供新鮮狼尾草及苜蓿草塊等粗料與清潔飲水，另每頭鹿隻每日補充 1,000 g 精料。

II. 精液採集

本採精試驗係配合民間鹿場提供之試驗公鹿進行，受限於鹿場動物調度與管理條件，因此，各試驗公鹿之採精頻率並未完全一致。5 頭試驗公鹿採精 1 次，2 頭公鹿採精 2 次間隔 3 週，每頭公鹿於採精進行前 24 小時禁水禁食，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 6 mL，同時肌肉注射 2 mL 阿托品 (Atropine; Atropine Sulfate 1 mg, 1 mg/mL, 臺灣)。鎮靜保定後，再以電激採精器 (Electroejaculator, EJ6CCGS, CGS Products Pty Ltd., Australia)，採用遞增式電刺激方式進行電激採精，初始電壓由低電壓開始，逐步提升至 2 V；於每一電壓階段以固定壓刺激 20 秒、停止刺激 8 秒為一循環，共進行 3 次循環，以採集公鹿精液。待精液流出後以 50 mL 之離心管收集精液，採集之精液於現場馬上進行精液性狀評估。經懸滴六級計分法 (0—5) 檢查活力評級為 4 級以上、利用苯胺黑—伊紅 (nigrosin-eosin, NE) 染色法評估存活率 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. 新鮮精液性狀評估

新鮮精液進行下列各性狀評估。

- (i) 精液量 (Semen volume)：公鹿所採集之精液原液以微量吸管進行精液量定量。
- (ii) 精子活力 (sperm motility)：各公鹿之精液樣品於採集 5 分鐘內，置於光學顯微鏡 (Nikon SE, Japan) 下，以懸滴六級計分法 (0—5) 判斷活力 (吳等, 2002)。
- (iii) 精子濃度 (sperm concentration)：各公鹿精液以 3% 食鹽水溶液稀釋 200 倍後，再以血球計數板置於正立顯微鏡下計算之。
- (iv) 異常形態 (abnormal morphology)：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)。異常形態精子可分為 3 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)：中節 (middle piece) 含有原生質滴者；3. 第

三型形態異常 (tertiary abnormal morphology)：尾部具缺陷者。

- (v) 精子存活率 (sperm viability)：利用苯胺黑－伊紅 (nigrosin-eosin, NE) 染色法評估，即將 5 μ L 原精液與 10 μ L 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觀察，其中呈現紅色或粉紅色者表示為死亡精子，活精子則不被染色呈現與光學背景相似之透明基色，評估至少 5 個視野內至少 200 個以上之精子以計算存活率。

IV. 精液之冷凍保存

本研究使用之精液稀釋液配方，包括 TCY、TY 或 CY 等 3 種，稀釋液成分，如表 1 所示。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% 與精子濃度為 1×10^9 個精子 / mL 以上之精液，先添加 1:1 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，再添加稀釋液至精子濃度 2×10^8 個精子 / mL，隔水放置在冷房中冷卻 1 小時以上，使精液緩慢降溫至 4°C。當精液溫度達 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，以達到最終含濃度為 6% 甘油濃度，添加抗凍劑稀釋液後，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液態面上方 4 cm 處平衡 5 分鐘，隨即投入 -196°C 液態氮中凍結後，再移至液態氮桶中保存。

表 1. TCY、TY 與 CY 稀釋液之配方

Table1. 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 (μ g)	250.0	250.0	250.0
Penicillin (μ g)	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 acid-yolk extender; TY: TEST-yolk extender; CY: citric acid-yolk extender.

V. 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), μ m/s)、平均直線運動速度 (straight line velocity (VSL), μ m/s)、平均曲線運動速度 (curvilinear velocity (VCL), μ m/s)、運動前向性 (sperm track straightness, STR, STR = VSL / VAP $\times$ 100; %) 與運動直線性 (linearity index, LIN, LIN = VSL / VCL $\times$ 100; %) 等性狀評估，將於液態氮桶中保存一週以上之冷凍精液解凍後稀釋至精子濃度 2.5×10^7 個精子 / mL，取 2.3 μ L 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 分鐘後，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，分別經 1、2 小時培養後利用 CASA 進行精液檢測評估。

VI. 發情同期化處理與人工授精

本研究於不同授精時間點 (56 – 62 小時) 進行人工授精時，公鹿冷凍精液之分配係兼顧鹿場實務與試驗控制原則進行。首先，依據鹿農族譜資料排除具親緣關係之公母鹿組合，以避免近親繁殖。在此基礎下，各授精時間組別採多公鹿交叉使用方式分配冷凍精液，使不同時間點皆涵蓋多來源公鹿精液，以降低公鹿個體差異對授精結果之影響。選取 3 至 8 歲具正常生殖週期且當年度無進行過發情同期化處理之母鹿進行發情同期化處理，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 330 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 2 mL 含 125

$\mu\text{g/mL}$ 之 $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Estrumate®, MSD, Germany)。在 CIDR® 移除後 56、58、60 或 62 小時，利用前述冷凍精液性狀評估較佳之冷凍精液，以每劑 0.5 mL 麥管含 5×10^7 個精子於每頭母鹿人工授精前取出立即經 37°C 解凍 30s 後，將冷凍精液經解凍後進行人工授精。並於授精後第 45 日後，以超音波掃描儀 (Prosound-2, Aloka, Japan) 配合直腸穿透型探頭 (Transrectum electronic linear probe, UTS-660, 7.5 MHz, Japan)，透過超音波掃描診斷子宮腔內胎兒影像確認懷孕。

VII 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，不同稀釋液之精子活力與參數比較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；比較不同授精時間對懷孕率之影響，使用一般線性模式程序進行單因子變異數分析 (Analysis of Variance, ANOVA)，並以 Tukey Honestly Significant Difference (HSD) 方法進行多重比較。

結果與討論

紅麋鹿為季節性繁殖明顯之鹿種，主要繁殖期僅自每年 9 月底至 11 月。由於公鹿生性敏感難以操作，馴化程度有限且極具攻擊性，以假陰道進行採精訓練並不容易，且公鹿之電激採精、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。故本研究乃先評估公紅麋鹿電激採精之精液品質，將供試之性成熟牡鹿，於 9 月底至 11 月期間進行麻醉保定後，以電激採精並分析精液性狀，進一步評估稀釋液種類對精液冷凍後品質之影響。

應用電激採精法進行牡紅麋鹿精液採集，所有牡鹿在於 9 月底至 11 月期間採得精液。公鹿精液之各性狀平均數據為精液量 1.5 ± 0.7 mL、精子活力 4.4 ± 0.7 、精子濃度 $18.5 \pm 9.9 \times 10^8$ 精子/mL、精子畸形率 $11.4 \pm 1.7\%$ 與精子存活率 $77.9 \pm 5.5\%$ (表 2)。本研究所採集 7 頭公鹿之各項精液性狀中，其中 6 頭之冷凍精液製作重要指標如精子活力與存活率均甚佳；且參考鄭 (2006) 之研究亦顯示以電激採精法取得臺灣山羌之精液量、精子活力與濃度，均顯著優於利用假陰道採精法者。因此，利用電激採精法採集紅麋鹿精液，為假陰道採精法外可行之策，所得精液將可應用於後續試驗。大部分鹿隻的精液採集方式是麻醉或鎮靜後使用電激採精 (Asher *et al.*, 1993)，儘管使用麻醉對於供採精鹿隻仍有風險，但相較使用自然交配再以假陰道採精的方式，面對處於繁殖季節攻擊性甚強之大型公鹿，電激採精對操作者更為安全，且比起假陰道採精只能適用於少數受過訓練的動物，此法可更廣泛應用於公鹿採精。

表 2. 公紅麋鹿之精液性狀 (Mean $\pm$ SEM)

Table 2. The semen traits of individual Red $\times$ Elk hybrid stag (Mean $\pm$ SEM)

	ID of individuals							Mean $\pm$ SEM
	A	B	C	D	E	F	G	
Age of year	5	8	10	9	7	9	10	—
Semen volume (mL)	2.3	2.0	1.4	0.9	2.2	1.1	0.7	1.5 ± 0.7
Sperm motility (0 — 5)	5.0	5.0	4.5	5.0	4.0	4.5	3.0	4.4 ± 0.7
Sperm concentration ($\times 10^8/\text{mL}$)	34.3	30.5	14.2	10.2	16.8	15.2	8.5	18.5 ± 9.9
Abnormal Morphology (%)	12.5	11.5	13.0	9.0	12.5	9.0	12.0	11.4 ± 1.7
Sperm viability (%)	78.0	80.0	88.0	76.5	70.0	75.0	78.0	77.9 ± 5.5

應用 TCY、TY 或 CY 稀釋液以最終濃度 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 Motility、Progressive motility、VCL、VAP、VSL、STR 與 LIN，各組間均無顯著差異 (表 3)。解凍 1 小時後之 TCY、TY 與 CY 三組在 Motility、VCL、VAP、VSL、STR 與 LIN 方面，各組間均無顯著差異；在 Progressive motility 方面，TCY 組為 $28.2 \pm 16.3\%$ ，顯著高於 TY 組之 $11.8 \pm 11.7\%$ ($P < 0.05$) (表 4)。解凍 2 小時後之 TCY、TY 與 CY 三組在 Motility、Progressive motility、VCL、VAP、VSL、STR 與 LIN 方面，各組間均無顯著差異 (表 5)，惟 TCY 組之結果相較於 TY 與 CY 二組，均有較佳之趨勢，此結果亦曾在 Cheng *et al.* (2004) 之研究中證實，而該研究顯示臺灣水鹿精液以 TCY 與 TY 為稀釋液所冷凍—解凍之精子存活率優於 CY 稀釋液；但不同於臺灣梅花鹿則以 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。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 Citric acid 之 TCY 組冷凍精液解凍 1 小時後，明顯較不含 Citric acid 之 TY 組之 Progressive motility 較高之重要關鍵。綜合解凍後各項精子品質指標分析結果顯示，於 Motility 方面，TCY 組在解凍即時及解凍後 1 與 2 小時皆維持較其他處理組為高之表現；而在 Progressive motility 方面，TCY 組於解凍後 1 與 2 小時亦呈現一致性優勢。整體而言，TCY 稀釋液於紅麋鹿精液冷凍保存後之運動性維持效果最佳，顯示其為較具優勢之冷凍保存稀釋液。

表 3. 不同稀釋液種類對紅麋鹿精液冷凍解凍後 0 小時活力及移動參數之影響

Table 3. Effects of extenders on sperm motility and motility parameters of Red × Elk hybrid stag 0 hr after frozen and thawed

Items	TCY (n = 9)	TY (n = 9)	CY (n = 9)
Motility (%)	46.7 ± 19.6*	31.6 ± 22.7	46.0 ± 18.4
Progressive motility (%)	35.2 ± 14.8	27.7 ± 21.3	37.4 ± 16.6
VCL (μm/s)	92.5 ± 19.4	90.3 ± 40.4	91.5 ± 29.0
VAP (μm/s)	71.2 ± 12.5	74.5 ± 30.5	77.5 ± 18.3
VSL (μm/s)	62.3 ± 9.7	66.3 ± 25.2	71.4 ± 9.8
STR (%)	83.3 ± 7.4	80.7 ± 28.8	88.0 ± 6.1
LIN (%)	68.4 ± 16.0	68.0 ± 27.1	80.3 ± 11.3

* 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.

表 4. 不同稀釋液種類對紅麋鹿精液冷凍解凍後 1 小時活力及移動參數之影響

Table 4. Effects of extenders on sperm motility and motility parameters of Red × Elk hybrid stag 1 hr after frozen and thawed

Items	TCY (n = 9)	TY (n = 9)	CY (n = 9)
Motility (%)	36.3 ± 20.2	19.1 ± 15.4	31.1 ± 18.5
Progressive motility (%)	28.2 ± 16.3 ^a	11.8 ± 11.7 ^b	22.8 ± 17.3 ^{a,b}
VCL (μm/s)	88.0 ± 14.6	78.6 ± 41.8	79.7 ± 30.9
VAP (μm/s)	70.7 ± 13.3	61.2 ± 33.0	65.3 ± 25.8
VSL (μm/s)	62.8 ± 12.3	52.8 ± 29.4	58.8 ± 15.4
STR (%)	85.1 ± 11.5	75.7 ± 29.6	86.6 ± 7.7
LIN (%)	73.0 ± 19.3	63.1 ± 28.4	77.3 ± 15.2

Abbreviation as Table 3.

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

表 5. 不同稀釋液種類對紅麋鹿精液冷凍解凍後 2 小時活力及移動參數之影響

Table 5. Effects of extenders on sperm motility and motility parameters of Red × Elk hybrid stag 2 hrs after frozen and thawed

Items	TCY (n = 9)	TY (n = 9)	CY (n = 9)
Motility (%)	22.4 ± 8.5	13.7 ± 14.5	14.7 ± 15.8
Progressive motility (%)	13.6 ± 5.2	9.5 ± 11.9	9.3 ± 13.1
VCL (μm/s)	78.2 ± 20.9	48.2 ± 44.0	55.5 ± 40.0
VAP (μm/s)	59.3 ± 10.0	35.5 ± 30.0	39.8 ± 26.9
VSL (μm/s)	52.1 ± 9.3	31.5 ± 26.9	34.9 ± 23.9
STR (%)	87.0 ± 8.1	56.2 ± 43.5	61.8 ± 39.3
LIN (%)	69.5 ± 15.8	46.0 ± 37.8	50.3 ± 35.3

Abbreviation as Table 3.

精液性狀檢查為評估精液稀釋液條件重要指標之一，然最可信方式是直接進行人工授精以評估其懷孕率。因此本試驗使用前述製備經解凍評估較佳之 TCY 組冷凍精液進行人工授精，其結果如表 6 所示，研究結果顯示 CIDR® 移除後第 58 小時進行人工授精之懷孕率為 57.9%，相近於 56 小時 (46.7%)，但明顯高於其他時距 (60 小時為 36.9%；62 小時為 42.8%) ($P < 0.05$)。56 至 62 h 全部鹿隻之整體平均懷孕率為 42.5% (54/127)，相近於 Bowers *et al.* (2004) 利用冷凍精液進行紅鹿之人工授精，可得到平均 41.6% 懷孕率，結果也類似 (Aller *et al.*, 2009) 於阿根廷地區利用紐西蘭進口冷凍精液進行紅鹿人工授精，整體平均懷孕率為 36.8% (14/38)。季節性繁殖的鹿科動物，母鹿在春季和夏季出現明顯的乏情期，且直到秋天開始發情前，普遍對發情同期化處理不會有排卵反應 (Morrow *et al.*, 1992)，因此大部分的人工授精只得在發情中或後期執行 (Asher *et al.*, 1993)。Lincoln and Short (1980) 指出季節繁殖週期的產生，是溫帶與北極鹿種受到光照改變進而影響其內源性機制誘導作用，大多數鹿種開始交配的行為在日光逐漸減少的夏末與秋季即為如此。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，由於發情觀察不易，因此鹿科動物目前大都以發情同期化處理後定時人工授精 (Synchronization of estrous and fixed-time artificial insemination, FTAI) (Aller *et al.*, 2009)。

表 6. 不同授精時間對紅麋鹿人工授精後懷孕率之影響

Table 6. Effect of timer on the pregnant rate of Red x Elk hybrid hinds inseminated with frozen semen

Hour of AI after CIDR® remove (h)	No. of service	No. of pregnancy	Pregnant rate (%)
56	15	7	46.7 ^a
58	19	11	57.9 ^a
60	65	24	36.9 ^b
62	28	12	42.8 ^c
Total	127	54	42.5

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

綜合前述，本研究已初步建立紅麋鹿精液可應用 TCY、TY 與 CY 三組稀釋液進行冷凍保存，結果顯示 TCY 組於解凍後之精子活力與移動參數有相對較佳之趨勢，可提供作為紅麋鹿進行精液冷凍之參考，而於 CIDR® 移除後第 58 小時實施 1 次人工授精可獲得最佳懷孕率，未來可應用於母紅麋鹿冷凍—解凍精液之配種策略中。

參考文獻

- 王治華、林信宏、康獻仁、郭卿雲、宋文霖、曾進輝、鄭木榮、劉炳燦、沈朋志。2010。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。畜產研究 43：317-326。
- 林信宏、郭廷雍、劉雅醇、張仲彰、楊鎮榮。2025。稀釋液對臺灣梅花鹿精液冷凍解凍後性狀之影響。畜產研究 58：32-38。
- 吳瑞得、董光中、馮翰鵬、郭財榮、蔡沛學、鄭豐邦。2002。畜養牡臺灣梅花鹿及牡臺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。臺灣獸醫誌 28：204-210。
- 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。
- Aller, J. F., O. Fernandez and E. Sanchez. 2009. Fixed-time artificial insemination in red deer (*Cervus elaphus*) in Argentina. Anim. Reprod. Sci. 115: 312-316.
- 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. pp. 365-375. In: Reproduction in farm animals. Hafez, E. S. E. and B. Hafez (eds.) Lippincott Williams and Wilkins, South Carolina, USA.
- 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., D. K. Berg, S. Beaumont, C. J. Morrow, K. T. O'Neill, and M. W. Fisher. 1996. Comparison of seasonal changes in reproduction parameters of adult male European fallow deer (*Dama dama*) and hybrid Mesopotamian x European fallow deer (*D. d. mesopotamica* x *D. d. dama*). Anim. Reprod. Sci. 45: 201-215.
- 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., A. M. Day, and G. K. Barrell. 1987. Annual cycle of liveweight and reproduction changes of farmed male fallow deer (*Dama dama*) and the effect of daily oral administration of melatonin in summer on the attainment of seasonal fertility. J. Reprod. Fertil. 79: 353-362.
- Bowers, S. D., G. G. Brown, T. A. Strauch, B. S. Gandy, D. A. Neuendorff, R. D. Randel, and S. T. Willard. 2004. Artificial insemination following observational versus electronic methods of estrus detection in red deer hinds (*Cervus elephus*). Theriogenology 62: 652-663.
- 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.
- Dean, R. E., E. T. Thorne, and I. J. Yorgason. 1976. Weights of Rocky Mountain Elk. J. Mammal. 57: 186-189.
- Fernández-Santos M. R., M. C. Estesó, 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.
- 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.
- Lincoln, G. A., and R. V. Short. 1980. Seasonal breeding: nature's contraceptive. Recent Prog. Horm. Res. 36: 1-52.
- Morrow, C. J., G. W. Asher, J. F. Smith, H. N. Jabbour, R. C. Mulley, and L. M. McLeay. 1992. Seasonal effects on the efficacy of intravaginal CIDR devices for oestrous synchronization of farmed fallow deer (*Dama dama*). Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod. 52: 165-169.
- 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.
- 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.
- SAS Institute. 2005. SAS/STAT Guide for personal computers. 9.1th ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Suzuki, M. 1993. Reproductive characteristics and morphology of accessory corpora lutea in sika deer in Hokkaido. In Deer of China (eds.) N. Ohtaishi, and H. I. Sheng, pp. 356-363. Elsevier Science Publishers. BV, Netherlands.
- Vishwanath, R. and P. Shannon. 2000. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim. Reprod. Sci. 62: 23-53.

Effects of extenders on semen quality of Red × Elk hybrid stag after freezing and thawing ⁽¹⁾

Hsin-Hung Lin ⁽²⁾ Ya-Chun Liu ⁽²⁾ Ting-Chieh Kang ⁽²⁾ Kai-Fei Tseng ⁽²⁾
Ting-Yung Kuo ⁽³⁾ and Jenn-Rong Yang ⁽³⁾⁽⁴⁾

Received: Oct. 31, 2025; Accepted: Feb. 23, 2026

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effects of extenders on the semen characteristics of Red x Elk hybrid stag after freezing and thawing. Semen samples were collected from healthy and sexually mature Red x Elk hybrid stags through electro-ejaculation, between October and December. The semens were diluted and frozen using Tris-citric acid-yolk (TCY), Tris hydroxymethyl-2-aminomethane-sulphonic acid-yolk (TEST-yolk; TY), and citric acid-yolk (CY) extenders. The experiment results showed that the mean semen characteristics before freezing and culture were as follows: semen volume 1.5 ± 0.7 mL, sperm motility 4.4 ± 0.7 , sperm concentration $18.5 \pm 9.9 \times 10^8$ sperm/mL, abnormal sperm rate $11.4 \pm 1.7\%$, and sperm viability $77.9 \pm 5.5\%$. The TCY group exhibited significantly higher progressive motility after only 1 hour of thawing ($P < 0.05$). Estrus synchronization was performed in all hinds, and artificial insemination was carried out at 56, 58, 60, or 62 hr after CIDR[®] (controlled internal drug release) removal using thawed semen from the TCY group. The pregnancy rate was highest (57.9%, 11/19) when insemination conducted at 58 hr after CIDR[®] removal, which was significantly greater than those at 60 hr and 62 hr ($P < 0.05$). The overall conception rate across all inseminations was 42.5% (54/127). In conclusion, the use of TCY extender for cryopreservation yielded superior post-thaw sperm progressive motility, and performing artificial insemination in 58 hr after CIDR[®] removal for optimal pregnancy rate in Red x Elk hybrid deer.

Key words: Red × Elk hybrid deer, Semen cryopreservation, Artificial insemination.

(1) Contribution No. 2850 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, Tainan 71246, Taiwan, R. O. C.

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