

## 壹、摘要

本試驗之目的乃在探討水鹿血液中雄性素含量、鹿角週期與精液性狀之季節性變化，並建立水鹿精液冷凍保存之方法。選擇健康、性成熟牡台灣水鹿 5 頭，暴露於自然光照下，每隔兩週以人力方式保定，自頸靜脈採集血液樣本，並以電刺激採精器採集精液樣本。血清以放射性免疫鑑定法測定其雄性素含量。所得精液立即進行各項檢查，並記錄之。品質良好之精液，則進行冷凍精液之製作。結果顯示，牡台灣水鹿血清中雄性素含量與精液品質，於 8~9 月間達到高峰，而在 2~4 月間達到最低水平。牡台灣水鹿於 2~3 月間解角，5~6 月間完成蛻茸，其茸角期長度為  $101 \pm 6$  (平均  $\pm$  SEM) 日，硬角期長度為  $242 \pm 5$  日。在冷凍精液製作中，冷凍、解凍後之精子存活率，在 Tris-蛋黃、Tris-檸檬酸-蛋黃與檸檬酸鈉-蛋黃等三種稀釋液間並無顯著差異；抗凍劑則以甘油之效果較 Dimethyl Sulfoxide (DMSO) 者為佳；加入甘油後之平衡時間以 12 小時為最佳；甘油濃度以 7% 為最佳。本研究之資料顯示，牡台灣水鹿血清中雄性素含量與精液性狀之季節性變化具有一致性。在血清中雄性素含量下降時解角，上升時蛻茸。牡台灣水鹿之精液冷凍保存，以 7% 甘油為抗凍劑，平衡 12 小時之效果為最佳。

## 貳、前言

一般而言，溫帶地區之各種牡鹿，其血液中雄性素含量、鹿角週期與精液性狀具有季節性變化。血液中雄性素含量與精液之量及品質約在秋季情慾季節到達之前或當中達到高峰，隨即下降，而於夏季降至最低。牡鹿之鹿角係在血液中睪固酮含量下降時解角；在睪固酮含量低時生長茸角；在睪固酮含量上升時骨化並蛻落茸毛，而成為骨質硬角。生長在亞熱帶之台灣水鹿（Formosan sambar deer; *Cervus unicolor swinhoei*）是否亦有相似之季節性變化？

鹿茸之產量或鹿角之大小及形狀，受遺傳影響甚大（楊，1995b）。在遺傳改良中，人工授精之使用具有不容置疑之重大貢獻。若能配合冷凍精液之使用，則效果更加顯著。在養鹿業者中，人工授精之應用仍在起始階段。但近年來，在紅鹿（red deer; *Cervus elaphus*）與？鹿（fallow deer; *Dama dama*）之試驗，人工授精之受孕率已可達 60-76%（Asher *et al.*, 1988a; 1990; Fennessy *et al.*, 1990; Jabbour *et al.*, 1993; Mulley *et al.*, 1988）。本研究室先前曾進行梅花鹿與水鹿人工授精之初步試驗，發現水鹿精液品質在個體間具有極大變異，常在需用時不能獲得理想精液。因此，水鹿精液冷凍保存，既重要且迫切。

有關鹿隻精液冷凍保存之研究，在多種鹿隻〔包括紅鹿、wapiti（American elk; *Cervus canadensis*）、？鹿、麇（Père David's deer; *Elaphurus davidianus*）、樞軸鹿（chital, spotted deer 或 axis deer; *Axis axis*）、坡鹿（Eld's deer; *Cervus eldi thamin*）、白尾鹿（white-tailed deer 或 virginia deer; *Odocoileus virginianus*）與馴鹿（reindeer 或 caribou; *Rangifer tarandus*）〕已有若干成果（reviewed by Asher *et al.*, 2000）。但在不同鹿種或不同作者所用之冷凍精液製備方法並不完全相同。

本試驗之目的乃在探討水鹿血液中雄性素含量 鹿角週期與精液性狀之季節性變化，並建立水鹿精液冷凍保存之方法。

## 參、文獻檢討

### 一、牡鹿生殖性狀之季節性變化

生活在溫帶地區之季節性生殖動物，大多在春、夏季生產子代，鹿隻亦然。一般鹿隻為在春、夏季產下仔鹿，溫帶鹿隻之配種活動集中於秋季。為達成配種之使命，牡鹿之睪丸發育、精液品質、雄性素產量及雄性特徵在秋季達到高峰。熱帶鹿隻之生殖週期則較不明顯，且與溫帶鹿隻不同。以下將分項探討牡鹿各項生殖性狀之一年內變化。

#### (一) 雄性素

一般而言，馴鹿 (reindeer 或 caribou; *Rangifer tarandus*) 生活之緯度最高，環境之季節性變化最明顯與嚴苛，為求種族之生存，馴鹿之生殖季節極度集中於一、二個月之內。以牡馴鹿與牡北美馴鹿為例，其血漿中睪固酮含量在七月中旬約為 1ng/ml，至八月初即明顯上升，約在九月中旬，更迅速增加至 30~60 ng/ml 之高峰，隨即迅速下降，在十月中旬至十一月初，其含量即低於 1ng/ml，其後即維持於該低水平，直至翌年八月為止 (Whitehead and McEwan, 1973)。

生活於北美洲之畜養或野生白尾鹿 (white-tailed deer 或 virginia deer; *Odocoileus virginianus*)，於三月至七月間，其血清或血漿中雄性素含量低，且無顯著變化，而於八月至九月間開始顯著上升，在十一月達到最高峰，十二月至一月間顯著下降，於六月降至最低 (Brown *et al.*, 1978; McMillin *et al.*, 1974; Mirarchi *et al.*, 1977b; 1978)。

黑尾鹿 (black-tailed deer; *Odocoileus hemionus columbianus*) 亦分佈於北美洲。畜養或野生之牡鹿，其血清或血漿中雄性素含量，在

情慾季節 ( rutting season ) 之前開始上升，在將進入情慾季節時 ( 八月底或九月初 ) 顯著上升，而於情慾季節前不久，或情慾季節當中 ( 十一月 ) 達到最高峰，隨即顯著下降，而於次年二月底或三月初降至最低水平 ( West and Nordan, 1976 )。

分佈於歐洲與亞洲之牡紅鹿 ( red deer; *Cervus elaphus* )，其血漿中之雄性素含量，在情慾季節之前偏低且無顯著變化，在將進入情慾季節時，其含量、脈衝頻率與脈衝幅度皆增加，在情慾季節 ( 九月至十一月 ) 當中，其含量與脈衝幅度增加更多 ( Lincoln, 1971; Lincoln and Kay, 1979; Lincoln *et al.*, 1970; Suttie *et al.*, 1984 )。在英國之一歲牡紅鹿，其血漿中之雄性素含量，在七月迅速上升，而分別於八月與十月時各達到一次高峰，隨即迅速下降，並維持於低水平，直至翌年七月才開始上升，但在二、三月時，睪固酮含量亦有一微小之上升 ( Suttie *et al.*, 1984; Suttie and Kay, 1985 )。在南半球之紐西蘭之牡紅鹿，其血漿中之雄性素含量於冬季與春季中均低於 1ng/ml，直至十二月底開始逐漸上升，而於四月時達到高峰 ( Barrell *et al.*, 1985 )。

分佈於北美洲之成年牡 Wapiti ( American elk; *Cervus canadensis* )，其血清中之雄性素含量，於九月達到高峰，於十一月顯著下降。二歲齡牡 Wapiti 血清中之雄性素含量，分別在九月、十一月、二月與四月各有一小高峰，唯含量均較成年者為低。所有牡 Wapiti 血清中之雄性素含量，在十一月底均下降至約 1ng/ml，其後則在 0.6~2.1ng/ml 之間起伏，直至三月中旬為止。至四月份，則更一步下降至最低水平 ( Haigh *et al.*, 1984 )。

牡？鹿 ( fallow deer; *Dama dama* ) 血清中之雄性素含量，在將進入情慾季節之前開始上升，於情慾季節中達到最高峰，隨即迅速下降並維持於極低含量 ( Asher *et al.*, 1987 )。其血漿中雄性素脈衝幅度與

脈衝頻率於情慾季節中，具有規則之一日節律 ( Asher *et al.*, 1989 )。其血漿中雄性素含量之脈衝頻率，於非情慾季節時維持低水平，於情慾季節之前開始增加，而於情慾季節時達到高峰 ( Asher and Peterson, 1991 )。

牡麋 ( roe deer; *Capreolus capreolus* ) 血漿中雄性素含量，於九月至一月間偏低，於二月至三月間開始上升，於七月至八月間顯著上升而達到最高峰，而於八月底迅速下降 ( Schams and Barth, 1982; Sempere and Boissin, 1981 )。由牡麋血漿中雄性素含量之季節性變化可知，其情慾季節介於七月與八月之間，此較其他溫帶鹿種為早。

由上述可知，生活於溫帶地區或極地之牡鹿，其血清中或血漿中雄性素之含量，對應於時間之變化，在各不同鹿種間，或同種鹿在不同地區，彼此之間略有差異，但一般而言，血清中或血漿中雄性素之含量，在情慾季節之前開始上升，在將進入情慾季節時上升更為快速，而於情慾季節前不久，或恰於情慾季節中，達到高峰，隨後雄性素含量即迅速下降。在所有各鹿種中，雄性素之含量從未維持一長久之高原狀態。

原產於熱帶地區之牡樞軸鹿 ( chital, spotted deer 或 axis deer; *Axis axis* ) 飼養於英國 ( 北溫帶地區 ) 者，其血漿中雄性素含量，於一月至二月間達到最低，而於六月至七月之間達到最高 ( Loudon and Curlewis, 1988 )。此一變化型式，似與溫帶鹿隻者不同。

原產於亞熱帶地區之牡坡鹿 ( Eld's deer; *Cervus eldi thamin* ) 飼養於北溫帶地區 ( 北緯 38° ) 者，其血清中雄性素之含量，於一月達到最高峰，於八月達到最低水平 ( Monfort *et al.*, 1993b )，而在情慾季節中，血漿中雄性素含量出現低頻率、大振幅之脈衝 ( Monfort *et al.*, 1993c )。就血清中雄性素含量變化之相對時間而言，牡坡鹿似較類似

於溫帶鹿隻，唯時間稍向後延遲約二個月。

台灣地處亞熱帶，牡鹿之生殖現象是否與溫帶地區者相似？牡台灣梅花鹿（Formosan sika deer; *Cervus nippon taiouanus*, *Cervus taivanus* 或 *Cervus taiouanus* Blyth）血漿中雄性素含量，於二月至六月間因個體差異大，故變化較不規則，於六月至八月間下降至最低點，且維持於低水平，於八月底至九月初之間開始上升，於十月中顯著上升，而於十月底至十一月初達到最高峰，隨即迅速下降，但一月至二月間仍維持相當高之水平（陳與楊，1995；楊，1994；1995a；楊與馬，1995）。在各季節中，台灣梅花鹿血漿中睪固酮含量一日內之基底濃度、平均濃度、平均高峰濃度與脈衝頻率，皆以在秋季者為最高，在夏季者為最低（楊與馬，1995）。牡台灣梅花鹿血液中雄性素含量之變化型式，顯然與溫帶地區之鹿隻相似。

可惜者，迄今尚未有文獻揭露，熱帶鹿種在熱帶地區，其血中雄性素含量之一年內變化情形。

## （二）睪丸組織

睪丸組織主要含有生精細管（seminiferous tubule）與間隙組織。前者職司精子之產生；後者職司雄性素之生產與分泌。因此，睪丸組織之型態學變化可反映牡鹿生殖功能之變化情形。

牡紅鹿睪丸中之生精細管直徑與精子生成作用皆呈現週期性之變化。在五月與六月，睪丸內之間隙細胞萎縮，生殖上皮退化至僅含有少數精原細胞（spermatogonium）與達到減數分裂接合絲期（zygotene phase）之初級精母細胞（primary spermatocyte），而無次級精母細胞（secondary spermatocyte）或精細胞（spermatid）。在六月底，精原細胞數目增加 2~3 倍。約在七月中，精子發生

( spermatogenesis ) 作用正常地進行，在大多數生精細管中，具有長形之精細胞，並且有少數精子 ( sperm; spermatozoon ) 到達附睪。在八月底與九月底，精子發生作用最旺盛。在情慾季節內，精子發生作用即已開始下降。至三月，生精細管內僅有少數成熟中之精子。在四月，精子發生作用即已結束，在生精細管內開始出現若干皺縮 ( pycnotic ) 之精細胞。至四月底，生殖上皮已不產生初級精母細胞階段以後之細胞 ( Lincoln, 1971 )。

野生牡紅鹿在秋季之生精細管長度、直徑及其管內組織、萊狄吉細胞 ( Leydig cell )、血管、管圍細胞 ( peritubular cell )、 $A_1$  精原細胞與精原細胞分裂產物等數目，均較在春季者為多，惟  $A_0$  精原細胞則較少。在進入情慾季節之前，精子發生作用已完全活化，並於情慾季節中達到最高峰，且於情慾季節結束後尚維持一段時間才下降 ( Hochereau-de Reviers and Lincoln, 1978 )。

牡黑尾鹿之睪丸組織亦有季節性變化。在三月，生殖上皮僅有一層賽透力細胞 ( Sertoli cell ) 與 A 型精原細胞。在五月，生精細管開始進行精子發生作用，此時出現 B 型精原細胞、初級精母細胞與次級精母細胞，但仍未有精子出現，間隙組織之體積亦尚未顯著增加。在七月，生精細管內具有頭巾 ( acrosome ) 階段之精細胞，但間隙組織之體積變化不大。在九月，生精細管明顯增大，所有精子發生之各階段細胞皆已存在，精子形成 ( spermiogenesis ) 已完整，但附睪內仍只含有未成熟之精子。在十一月，生殖上皮之活動活躍，附睪 ( epididymis ) 與輸精管 ( ductus deferens ) 內充滿精子。在一月，40~60 % 之生精細管已停止精子發生作用，上皮細胞處於萎縮狀態，賽透力細胞之細胞質出現空泡，生精細管內無精子存在，間隙組織萎縮，萊狄吉細胞小而扁平 ( West and Nordan, 1976 )。



其他鹿種，如白尾鹿 (Robinson *et al.*, 1965; Wislocki *et al.*, 1947)、騾鹿 (mule deer; *Odocoileus hemionus*) (Markwald *et al.*, 1971) ？ 鹿 (Chaplin and White, 1972) 之睪丸組織亦有季節性變化，約於情慾季節到達之前或當中，睪丸組織功能達到極致，而在情慾季節結束後，睪丸組織功能下降。

一般而言，溫帶地區之各鹿種在進入情慾季節之前，精子發生作用已經完全恢復，並在情慾季節期間達到最旺盛之狀態，且在情慾季節結束之後仍然維持一段時間，而來狄吉細胞活動之恢復，則開始較晚，並在情慾季節期間即已開始萎縮。

### (三) 睪丸重量、大小

季節性生殖之動物，其睪丸大小常有明顯之季節性變化：睪丸大多在生殖季節中較大；在非生殖季節中較小，有些動物之睪丸甚至在非生殖季節中縮入腹腔。

牡紅鹿之睪丸重量於九月最重，隨即迅速減輕，而於五月與六月減至最輕，六月後再迅速增加，如此週而復始 (Lincoln, 1971)。其他報告亦顯示，牡紅鹿之睪丸體積、直徑與陰囊周長，在將進入情慾季節之前或情慾季節當中達到最高峰，而於情慾季節結束後，即開始下降 (Hochereau-de Reviers and Lincoln, 1978; Suttie *et al.*, 1984)。

牡 Wapiti 之陰囊周長，在整年之中具有非常顯著之變化，自六月初開始迅速增加，於九月初達到最長，隨之即緩慢縮短，直至十一月中旬或十二月初為止，隨後 2.5~3 個月中，僅具有 0.5~1.5 cm 之變動範圍，此後再經過 2.5 個月之急速縮短，而於翌年四月底達到最短 (Haigh *et al.*, 1984)。

牡？ 鹿之睪丸與附睪重量於發身之後即受到季節變化的影響，兩

者之季節性變化相似，兩者之重量於情慾季節（十月至十一月）達到最重（Chaplin and White, 1972; Chapman and Chapman, 1979）。牡？鹿之睪丸體積於七月至八月間開始增加，而在情慾季節即將到達之前（約十月份）達到最高峰，隨即開始縮小，在十二月已縮小至最大體積之 50%，並持續縮小直至二、三月間，而於四月底達到最小，此時約為最大體積之 25%（Gosch and Fischer, 1989）。另有報告亦顯示，牡？鹿之睪丸直徑於將近情慾季節前達到最大，爾後隨著情慾季節的結束而下降，而於初夏時達到最小（Asher *et al.*, 1987）。

在野生成年黑尾鹿，睪丸體積之變異也可反應睪丸活動之季節性型式。自五月至十一月，睪丸體積增加三至五倍；然後自一月至五月則明顯縮小，而舍飼黑尾鹿睪丸體積之季節性變化也與野生者相似，在十月至十一月時最大，三月至六月時最小（West and Nordan, 1976）。

牡白尾鹿之睪丸與附睪重量在二月至六月間維持於最低水平，於六月至七月間開始顯著增加，而在十一月達到最重（白尾鹿之情慾季節約為九月至隔年一月）（Mirarchi *et al.*, 1977a）。

成熟牡麋之睪丸重量於三月底開始增加，而在情慾季節（七月至八月）當中達到高峰，隨即開始下降，並於十二月降至最輕。一歲齡牡麋之睪丸重量開始增加之時間較成熟牡麋者為晚，但亦在情慾季節當中達到高峰後即下降，且下降幅度大於成熟牡麋者，而於十月即已降至最輕（Blottner *et al.*, 1996）。

以上資料顯示，溫帶鹿隻睪丸之功能在情慾之前不久、或在情慾季節期間，恢復至最佳狀況，在情慾季節結束後，即開始減退，直至下次情慾季節前，才逐漸恢復功能。

與上述情形不相同者為熱帶地區之鹿隻。牡樞軸鹿之睪丸平均直徑並無季節性變化，但如將解角期間之直徑予以標準化後，則可見其

睪丸直徑以在解角後 1~2 個月（約於一月至二月間）最小，而最大直徑則發生於硬角期間（約於六月至七月間），惟最小值仍至少有最大值之 70%（Loudon and Curlewis, 1988）。然而，飼養於北溫帶地區（北緯 38°）之牡坡鹿（另一種熱帶鹿種），其陰囊周長與睪丸體積於二月達到最大，於九月時達到最小（Monfort *et al.*, 1993b），而顯示季節性之變化。

台灣梅花鹿睪丸體積在秋季亦顯著較其他季節為大（楊與馬，1995），更詳細之數據顯示梅花鹿睪丸在六、七月份萎縮至最小，隨後逐漸增大，而於 10~11 月達到高峰，然後逐漸萎縮（陳與楊，1995；楊，1994；1995a；楊與陳，1994b）。此種變化型式與上述溫帶鹿種者相似。

#### （四）精液品質

自八月份開始，利用電刺激採精器每隔兩週收集白尾鹿之精液一次，直至次年三月為止，顯示每次射精之精子數目在十月份逐漸增加，至十一月中旬達到高峰，約在十二月中旬，即迅速下降至約最大值之 50%，此後再緩慢下降。射精之精子數目達到高峰時，平均每次射精  $3.4 \times 10^9$  個精子。精液中之精子濃度，於十一月初達到一高峰，並維持至一月初。精液中有活動力之精子百分率，在八月、二月與三月時顯然較十月至一月時為低（Lambiase *et al.*, 1972）。

黑尾鹿之精子生產，以在生殖季節為最多，自十月至隔年一月之間，精子濃度為  $100 \times 10^6 \sim 700 \times 10^6$ /ml，而在非生殖季節，則下降至  $0 \sim 30 \times 10^6$ /ml。在春季，精子濃度有一明顯之增加，但在此短暫之活躍期以後，精子濃度又行下降，並且在整個夏季月份中維持於低濃度。然而，有些舍飼黑尾鹿整年均可產生精子，惟在春季與夏季月份

中，精子之活力弱，活精子比例低( 0~60% )，異常精子比例高( 35~90% ) ( West and Nordan, 1976 )。

利用電刺激採精器每隔 12~17 日收集 Wapiti 之精液一次，歷時一年，結果發現，六月十五日與七月三日之精液樣品中無精子存在，七月十三日有四分之三樣品含有精子，但混有細胞碎片，七月三十日之精液樣品均含有不同數目之精子，而精液中正常精子之百分率以九月一日最高，但自九月一日起至次年三月十五日為止之期間內均無顯著差異，此後至四月底為止，所有精液樣品中，僅有一個精液樣品含有少許精子，其餘皆不含精子 ( Haigh *et al.*, 1984 )。

在夏季採集之？鹿精液，缺乏具有活力之精子，而於情慾季節前不久、情慾季節將結束時，或初春所採集之？鹿精液則含有大量具有活力之精子 ( Asher *et al.*, 1987 )。五月至八月間 ( 鹿角生長期間 ) 採集之？鹿精液量顯著較其餘時間 ( 九月至次年四月 ) 所得者為少 (  $0.7 \pm 0.4$  ml vs  $1.1 \pm 0.4$  ml )。八月至次年五月間，採集之精液具有活精子；其中，十月至次年二月間，每次射精之精子數超過十億，但個體間有很大變異 ( 2~40 億 )；六月至七月間，精液中精子數目極少或完全沒有。在九月至十月中旬之間，以及十二月至隔年四月中旬之間，精子活力均不低於 60% 或第三級。九月至隔年三月之精液品質為最佳，其正常精子比例佔 60% 或以上 ( Gosch and Fischer, 1989 )。

取自牡麋附睪之精子，於情慾季節時，具有最佳之型態與最完整之功能，其正常精子比例在情慾季節前、情慾季節中與情慾季節後，分別為  $52.1 \pm 19.1\%$ 、 $62.3 \pm 14.4\%$  與  $38.0 \pm 28.5\%$  ( Blotner *et al.*, 1996 )。

樞軸鹿屬於熱帶鹿種，整年皆可以生殖，即使在鹿角生長期間，其精液品質仍然甚佳。在茸角期、硬角期之首四個月與硬角期之末四

個月，精液之平均精子濃度分別為  $8.2 \pm 2.9 \times 10^7/\text{ml}$ 、 $9.6 \pm 6.6 \times 10^7/\text{ml}$  與  $11.3 \pm 3.4 \times 10^7/\text{ml}$ ；精子之平均活力分別為 55% (0~80%)、63% (20~85%) 與 68% (20~80%) (Loudon and Curlewis, 1988)。

飼養於美國之 Eld's deer，一年四季皆可採得具有活力精子之精液，但於冬季與春季所採集之精液具有最佳之精子活力 (Monfort *et al.*, 1993b)。

#### (五) 鹿角週期

鹿角 (antler) 為鹿科動物之重要特徵之一，為額骨之延伸組織，牡鹿之第二性徵。在正常情況下，僅牡鹿具有鹿角，但麝 (musk deer; *Moschus moschiferus*) 與中國水鹿 (又稱牙獐, Chinese water deer; *Hydropotes inermis*) 雌雄皆不具鹿角，馴鹿則雌雄皆有鹿角。鹿角為一暫時性、可脫落之組織，附生於鹿隻前額骨之骨質突起-角座 (pedicle) 上，其組織之形態隨時間之不同而有差異。當鹿角剛自角座長出時，其組織柔軟，外披一層含有細密茸毛之皮膚，內含豐富之血管與神經纖維，此時稱之為茸角 (velvet antler)。當茸角繼續生長時，其基部逐漸向頂端硬化成骨狀組織。當茸角停止生長並完成骨化後，茸毛皮膚即逐漸乾涸、死亡，並自鹿角剝離，而顯露出硬角，此一過程即稱之為蛻茸 (cleaning or shedding of velvet)。硬角經過一段時間後，即自行脫落，而於角座上留下傷口，此一過程稱之為解角 (cast)。解角後，傷口即癒合成痂，經過一段或長或短之靜休期後，新角即自此長出。此種週而復始之現象，通常稱為鹿角週期或鹿角生長週期。

一般而言，溫帶地區之鹿隻，其新茸角約在春季開始生長，歷經 3~5 個月之茸角期 (但真正之生長期約為 100 日)，而於秋季蛻茸

( Goss, 1983 ); 在生殖季節後不久, 如〔麋 ( moose; *Alces alces* ) 與白尾鹿], 或翌年春季,〔如紅鹿與日本梅花鹿( sika; *Cervus nippon* )], 舊角即自角座與鹿角接合處( pedicle-antler junction )脫落( Goss, 1983; Mirarchi *et al.*, 1977b )。

在美國之日本梅花鹿, 約在五月初解角, 並開始生長茸角, 而約於秋分蛻茸 ( Goss, 1969a )。

就棲息於英國之紅鹿而言, 成年牡鹿約在四月初解角, 隨即迅速生長茸角, 而於八月初開始蛻落茸毛, 九月中旬開始進入情慾季節, 此時已形成硬角 ( Lincoln *et al.*, 1970 )。

成年牡白尾鹿在生殖季節後不久( 一月中旬), 即開始陸續解角, 經過一段靜休期後, 約至四月中旬才開始生長茸角, 而於九月中旬蛻茸, 並維持於硬角狀態, 直至生殖季節結束 ( Brown *et al.*, 1983; Mirarchi *et al.*, 1977b )。

鹿角之生長曲線呈 S 形, 初時緩慢, 中期快速, 而在晚期又變慢, 例如, 成年牡白尾鹿之茸角於四月中旬開始生長, 至五月中旬前, 其長度增加有限, 而於八月中旬時, 其鹿角之主支長度已達到極致 ( Snyder *et al.*, 1983 )。成年牡紅鹿之鹿角生長期間( 自解角至蛻茸 ), 約為五個月。在此茸角生長期間, 最初四週內, 茸角生長速度緩慢, 此時之主支長度約為最終長度之 21%; 四週之後茸角生長速度加快, 至解角後 16 週時, 主支長度已達最終長度之 95%, 此後, 鹿角長度即不再顯著增加 ( Muir *et al.*, 1985 )。

在熱帶地區之鹿隻, 如樞軸鹿, 鹿角之生長、蛻茸與解角, 並無明顯季節性, 但大部分鹿隻之鹿角週期皆維持一年一次之節律 ( Loudon and Curlewis, 1988 )。

台灣梅花鹿因年份、年齡及其他因素之不同, 平均解角日期自四

月變異至七月，而平均蛻茸日期卻十分整齊地發生於十月份（陳與楊，1995；楊，1993；1994；1995a；楊與馬，1994；楊與陳，1994b）。此種鹿角週期與溫帶地區之鹿隻相類似。

台灣水鹿（Formosan sambar deer; *Cervus unicolor swinhoei*）解角之日期分佈於十二月至五月，但主要集中於二月與三月（楊與陳，1994a），此顯示雖然解角日期較不整齊，但仍有季節性。在印度之印度水鹿，其解角發生於三月至八月，而集中於四月至六月（Acharjyo, 1983）。在美國之印度水鹿，其解角發生於三月至七月，而集中於四月至六月（Shea *et al.*, 1990）。中國大陸之水鹿整年皆有鹿隻解角，但發生於三月至六月者佔 83.6%（盛，1992）。此等資料顯示水鹿之解角時間亦有季節性。然而，亦有報告指出在紐約動物園之印度水鹿（Indian sambar; *Cervus unicolor niger*）與馬來亞水鹿（Malayan sambar; *Cervus unicolor equinus*），其解角並無季節性（Crandall, 1964）。

綜合上述，牡鹿鹿角之生長、蛻茸與解角具有明確之週期性，若與前述段落相對照，則可發現鹿角週期與生殖週期彼此密切關連。在所有已被研究之各鹿種中，如紅鹿（Lincoln *et al.*, 1970）、馴鹿（Whitehead and McEwan, 1973）、白尾鹿（Brown *et al.*, 1978; McMillin *et al.*, 1974; Mirarchi *et al.*, 1975; 1977b）、黑尾鹿（West and Nordan, 1976）、麋（Sempere and Boissin, 1981）與台灣梅花鹿（陳與楊，1995；楊，1993；1994；1995a；楊與馬，1994；楊與陳，1994b）均顯示：牡鹿之鹿角係在血液中雄性素含量下降時解角；在雄性素含量低時生長茸角；在雄性素含量上升時骨化並蛻落茸毛，而成為骨質硬角。去勢與睪固酮補償處理之試驗結果顯示，鹿角茸毛之蛻落、鹿角之骨化與硬角之維持，皆有賴於雄性素之存在，但雄性素抑制茸角

之生長 ( Wislocki *et al.*, 1947 )。在白尾鹿硬角期間給予雄性素接受體阻斷劑 cyproterone acetate ( CPA ), 可引起提早解角 ( Bubenik, 1983 ); 而在茸角期間給予 CPA , 則可延遲鹿角骨化與蛻茸 ( Bubenik *et al.*, 1975 )。注射長效性助孕素 medroxyprogesterone acetate ( MPA ), 可以抑制 LH 分泌, 再轉而抑制雄性素之分泌, 故可致台灣梅花鹿 ( 陳等, 1998 ) 與紅鹿 ( Short and McNatty, 1985; Suttie *et al.*, 1995 ) 提早解角。進一步之研究結果顯示, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone 可引起茸毛皮膚之乾涸與色素沈著, 亦可引起鹿角之鈣化, 但不完全; 可芳香化之類固醇, 可以導致充分鈣化, 但不能引起蛻茸 ( Morris and Bubenik, 1983 )。此等結果暗示, 睪固酮可能經由轉變為動情素後, 與茸角之動情素接受體結合, 而促進鹿角之鈣化; 睪固酮亦可能經由轉變為 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone 後, 與茸角之雄性素接受體結合, 而促進茸毛之蛻落。

## 二、鹿隻精液之收集

一般而言, 採精的技術有兩大類: 一類為人工陰道的使用; 另一類為直腸電刺激採精法。其中, 以人工陰道採精對動物及精子較佳, 因人工陰道之使用, 可以降低對動物之緊迫與減少精子樣本之污染。在鹿隻無保定狀況下, 可藉由假母鹿配合人工陰道來誘導公鹿駕乘並射精以取得精液。利用人工陰道採精法, 可獲得精子濃度較高, 且輔性腺分泌物較少之精液。但公鹿在情慾季節時, 性情暴躁、攻擊性強, 難以控制其駕乘假母鹿以取得精液。因此, 除馴鹿外, 其它鹿種很難使用人工陰道採精法。

### (一) 人工陰道採精法

人工陰道乃在模仿母畜陰道所給予的感覺。當然, 各種動物對於不同感覺的敏感性不盡相同, 有的動物 ( 如牛、山羊 ) 對於溫度十分



敏感，有的動物（如馬、驢）對於壓力十分敏感。另外，人工陰道通常需能調節溫度與壓力，同時也要賦予潤滑的內表面。同時，在高緯度地區，為了避免低溫對精子造成冷休克，通常精液收集管都必須浸在一個保持溫度的水浴中。在使用人工陰道法採精之前，雄性動物必先經過訓練，以期能順利取得精液。在採精之時，提供一個假母台，讓雄性動物駕乘並射精，也常使用發情母畜（自然發情，或人為誘發發情）誘發雄性動物之駕乘及射精。

Dott and Utsi (1971) 以綿羊之人工陰道收集馴鹿之精液。將試情母馴鹿以韁繩縛於柱子上，再引入牡馴鹿。通常在幾分鐘內，牡鹿即開始以鼻子愛撫牝鹿之生殖器區域，摩擦並將頭置於牝鹿臀部。如果牝鹿排尿，則牡鹿即抬頭，並捲起上唇，此即為 Flemen 反應。有時在駕乘之前，有時在駕乘當中或牝鹿已經兩腳打開地站立之後，牡鹿陰莖即自包皮伸出。當陰莖與人工陰道接觸時，牡鹿會顯示出幾次短而快之衝刺，隨後即有一陣劇烈之射精衝刺，此時牡鹿之腳跳離地面。通常在射精以前並不需調情太久。試情牝鹿亦不必發情，僅需容易控制即可。Dott and Utsi (1971) 在該試驗中，共自 6 頭健全牡鹿採得 19 個樣本。

在紅鹿 (Strzezek *et al.*, 1985)、麋 (Krzywinski, 1987) 與麇 (Krzywinski, 1987)，也都曾被使用人工陰道採精法採得精液。

## (二) 直腸電刺激採精法

以電刺激採精器經由直腸刺激陰部神經，可以成功地使牡鹿陰莖勃起與射精。然而，電刺激採精對動物之傷害較大，且所得精液較常被尿液污染。為減少尿液之污染，常在採精之前禁水一段時間，或在鹿隻排尿之後立即採精。在電刺激採精之前，常先將直腸糞便掏出。

進行電刺激採精時，需先由低電壓開始，逐步增強電壓，且每段電壓刺激數次之後，方可再行增加電壓。

在實際應用中，鹿隻之精液收集大多採用直腸電刺激採精法 ( Asher *et al.*, 1993 )。相較於人工陰道採精法，若配合麻醉藥物之使用，直腸電刺激採精法對於操作人員將是一個更安全且更省時之方法。時至今日，直腸電刺激採精法與人工陰道採精法，所獲得之精液量與精液品質已無顯著差異 ( Asher *et al.*, 2000 )。

Dott and Utsi ( 1971 ) 敘述馴鹿之直腸電刺激採精法如下：

使用長 33 公分，直徑 2.5 公分之透明壓克力探針，含有八個長 15 公分×寬 0.3 公分之銅電極( 每一個都從距離頂端 4 公分處開始 )。使用 12 V 蓄電池之 60 周 / 秒交流電 以此方式, Dott and Utsi ( 1971 ) 雖可自輸精管截除牡馴鹿採得精液樣本，但並非每次成功。此結果似乎暗示電刺激採精之成功率不如人工陰道採精者。

West and Nordan ( 1976 ) 敘述黑尾鹿之直腸電刺激採精法如下：

鹿隻以每公斤體重肌肉注射 0.05~0.06 mg succinylcholine chloride 制動後施行直腸電刺激採精法。使用綿羊直腸探針之 AC 電刺激採精器，將探針插入直腸後，以電刺激間歇刺激( 開 2 秒關 5 秒 )，逐漸增加電壓至 3 V，電刺激一直重複至射精為止。通常每次射精約需 10~20 次刺激，其所需刺激之次數受生殖狀態影響較大，而受制動程度影響較小。在完全的生殖狀態中，鹿隻皆可顯示出勃起與完全射精。

Haigh *et al.* (1984) 敘述 Wapiti 之直腸電刺激採精法如下：

在電刺激採精之前，牡 Wapiti 先被用化學或物理方式固定，然後清理直腸，並按摩輔性腺。若是採用化學固定，則動物以側臥姿勢被採精，並由兩個人負責拉出陰莖與持拿收集裝置。所使用之採精器探

針，其長度為 29 公分，直徑為 5.5 公分，在腹面具有間隔 1 公分之三  
個縱電極，電源為 110 V、60 周 / 秒。探針全長插入，如同在公牛  
一樣地進行電刺激。通常，在站立之動物中，勃起發生於刺激早期。  
初始射出數滴澄清液體，此部分不予收集。隨後將射出少量 ( 0.4~1.5  
ml ) 乳狀至乳油狀、富含精子之液體，此在 2~5 次刺激中被收集。若  
再進一步刺激，則會產生黏稠狀之黃色物質，此部分為類似貯精囊之  
分泌物。

Asher *et al.* (1987) 敘述？鹿之直腸電刺激採精法如下：

牡？鹿先被以每公斤體重肌肉注射 5 mg katamine hydrochloride  
+ 5 mg xylazine 鎮靜。然後以 12 V 乾電池之直腸探針( 長度 25 公分，  
直徑 2.5 公分，具有兩個側電極 ) 進行電刺激採精。探針先用潤滑劑  
充分塗抹後，插入約 15 公分。每間隔 5 秒持續刺激 5 秒，約 2~3 次  
刺激後即射精。

另外，Gosch and Fischer ( 1989 ) 亦敘述？鹿之直腸電刺激採精  
法，如下：

牡？鹿在電刺激採精前，先以 2~2.5 ml Hellabrunner mixture 制  
動。所使用之探針為雙極直腸探針，其長度為 30 公分，直徑為 2.8  
公分，具有間隔 0.7 公分之三級表面電極。使用時，將探針全長插入，  
電極朝向腹側。刺激器可產生 50 Hz 之正弦波，並具有可變之輸出電  
壓 ( 0~23 V )。使用 5 ml 之試管接上漏斗供收集精液之用，且將其裝  
置在內含 39 °C 水浴之塑膠瓶中。

以一系列逐漸增加之電刺激進行採精，各次刺激以一約 30 秒之  
停頓分開。每次刺激之最大電壓隨著每一次刺激而逐漸增加，每次刺  
激約 3~5 秒，然後迅速下降至 0 V。刺激總次數限制約 15 次，以使  
鹿隻緊迫降至最低。

此種採精方法，在 158 次施行中，成功了 157 次。通常發軔射精約需要 3~5 次刺激。在大部分情況中，陰莖皆會伸出，並且都在刺激早期中即伸出。所得之精液量從少數幾滴到 2.5 ml 皆有。

Loudon and Curlewis ( 1988 ) 敘述樞軸鹿之直腸電刺激採精法如下：

牡樞軸鹿先被鎮靜後，再施行電刺激採精法。所使用採精器為 30×2.5 公分之直腸探針，具有兩側條電極，與一個手提式電池，提供 20~80 周 / 秒與 2~12 V 之電刺激。試驗期間( 包括硬角期與茸角期 )，40 次採精中，有 33 次可採得精液樣本。

Fennessy *et al.* ( 1990 ) 敘述紅鹿之直腸電刺激採精法如下：

牡紅鹿先以肌肉注射 1.2 ml fentanyl citrate、azaperone 與 xylazine hydrochloride 混合物麻醉 ( 每 ml 混合物中包含 2 mg fentanyl citrate、16 mg azaperone 與 100 mg xylazine )。所使用之電刺激器，其探針長度為 24 公分，直徑為 5 公分 ( Lane Manufacturing Inc., 5560 E Pacific Place, Denver, Colorado 80222, U. S. A. )。採精完畢之後，以靜脈注射 4 ml nalorphine 與 yohimbine 混合物解除麻醉 ( 每 ml 混合物中包含 1 mg nalorphine 與 10 mg yohimbine )。所得之結果變異大，雖有一些樣品被成功地收集，但亦有部份樣品遭受尿液或貯精囊液 ( seminal vesicular fluid ) 污染。

Monfort *et al.* ( 1993a ) 敘述坡鹿之直腸電刺激採精法如下：

牡坡鹿先被以每公斤體重肌肉注射 2 mg katamine hydrochloride + 0.25 mg xylazine hydrochloride 深度鎮靜。所使用電刺激採精器可提供 60 Hz 之正弦波，所使用之探針為 Teflon 直腸探針。電壓 4 V、5 V 與 6 V 分別連續刺激 10 次，每次 3 秒鐘；休息 5 分鐘之後，電壓 5 V、6 V 與 7 V 分別連續刺激 10 次，每次 3 秒鐘；休息 5 分鐘之後，

電壓 6 V、7 V 與 8 V 分別連續刺激 10 次，每次 3 秒鐘。以此方式，作者可採得高品質之精液。

其他研究人員也在同種鹿或其他鹿種曾成功地以電刺激採精法採精過，例如紅鹿 ( Asher *et al.*, 1988b; Bainbridge *et al.*, 1999; Jaczewski and Jasiorowski, 1974 ) 麕 ( Asher *et al.*, 1988a; 1990; 1996; Jabbour *et al.*, 1993; Mulley *et al.*, 1988 ) 白尾鹿 ( Bierschwal *et al.*, 1970; Jacobson *et al.*, 1989; Magyar *et al.*, 1989 ) 麀 ( Père David's deer ; *Elaphurus davidianus* ) ( Argo *et al.*, 1994; Asher *et al.*, 1988b ) Wapiti ( Haigh and Bowen, 1991 ) Wapiti × 日本梅花鹿 ( Willard *et al.*, 1996 )。

### (三) 其他收集精液之方法

鹿隻精液之收集亦可由死後鹿隻之附睪取得 ( Asher *et al.*, 2000 )。在紅鹿 ( Krzywinski, 1981 ) 麀 ( Krzywinski, 1981 ) 白尾鹿 ( Jacobson *et al.*, 1989 )，皆曾使用此法取得精液。此種採精方法在畜牧上雖無實用價值，但對稀有動物之保種可能具有價值。

## 三、精液檢查

精液採得後，必須先做檢查，僅有品質高之精液才可能具有高受精率，也才有使用價值。精液性狀之檢查，對於評估雄畜之生育力為一項重要參考指標。最能代表生育力之方式為直接讓母畜配種，觀察母畜是否能成功懷孕，但是此法將因增加母畜生殖系統健康與否及其它種種變因，而使評估更加費時費力。精液之物理性狀及顯微鏡檢查結果，雖然不能完全反映雄畜之生育力，但因方便、省時、省力與省錢，而常被作為評估公畜生育力之參考指標 ( Bearden and Fuquay, 1997 )。

精液採集後應立刻置於 35 ℃ 之水浴中，並儘快進行精液檢查。  
較常評估精液品質之項目如下：

### （一）精液量

利用具有刻度之離心管收集精液，即可知道射精量。不同動物之精液量具有差異（ Garner and Hafez, 2000 ）。

### （二）精液外觀顏色

將裝有精液之透明離心管置於光線充足處，以肉眼檢查。正常公畜精液應為乳白色、不太透明，偶而略帶黃色。若精液內含有血液，則帶紅色；若精液內含有膿汁，則帶綠色；若精液內含有尿液，則帶黃色。精液若是受到血液、膿汁、糞便、尿液或其它外物污染，則不可使用。由乳白色之濃淡程度，可推測精子濃度之高低。精子濃度低之樣品呈水狀或較透明（ Bearden and Fuquay, 1997 ）。

### （三）精子活力

將一滴精液滴在恆溫板上之載玻片（ 35-37 ℃ ）上，於顯微鏡下觀察精子活力。正常精子游動方式為螺旋形直線快速前進，其它游動方式，如緩慢前進、原地繞圈，則與前進活動者在活力上具有程度上之差異。

在顯微鏡低倍數鏡頭下觀察精子活力，活力最強之精液，看起來像是一團漩渦在運動；活力次強之精液，看起來像是波浪；活力較差之精液，不產生漩渦或波浪，甚至靜止不動。在顯微鏡高倍數鏡頭下觀察個別精子活力，正常向前運動之精子比例越高，則精液品質越好。此種判斷方式為相當主觀地做相對性比較，並不適用於做絕對性比較。以牛而言，精液樣品初始活力低於 40% 者不適於使用，除非

精液採自特優公牛 ( Bearden and Fuquay, 1997 )。

為能精確判斷精子之活力，稀釋過之精液亦能用於精子活力之評估，但具有黏性之稀釋液可能會抑制精子漩渦運動之形成，此時，應以精子前進運動速度作為評估之依據 ( 吳，1992 )。

#### (四) 精子濃度

精液之精子濃度測定方法如下：

##### 1. 紅血球計數板法

精液樣本先利用紅血球計數器之稀釋管稀釋，再置於血球計數板上，於顯微鏡高倍 ( 400 倍 ) 鏡頭下計算。計算精子濃度所使用之稀釋液需能殺死精子，使精子在血球計數盤上不能運動，方能正確計算精子之濃度。計算精子濃度所需稀釋倍數，視原精液之精子濃度而定 ( 吳，1992 )。

##### 2. 光電比色法

此法為計算精子濃度迅速而實用之方法。其原理是以光透過標準稀釋精液多少為依據。此比色計必須先標準化，其標準化是先由紅血球計數板法決定已知精子濃度之後，再予以換算應用 ( 吳，1992 )。

##### 3. 視覺判定

由不透明度快速判定精子濃度。利用氯化鋇 ( Barium chloride ) 與硫化銅 ( Copper sulfide ) 調製不同濃度之硫化鋇 ( Barium sulfide ) 不透明標準液，分為五個不同濃度，0.06%、0.09%、0.12%、0.15%、0.18%。原精液以 10 倍枸鹽酸鈉 ( Sodium citrate ) 稀釋液稀釋後，與不同濃度標準液比較，可快速了解精子濃度 ( 吳，1992 )。

##### 4. 自動紅血球數目測定儀

此法為目前最快速、準確性最高之方法，於製造冷凍精液之場所

相當實用，唯儀器價錢較高（吳，1992）。

精子濃度，除了個體因素差異，如睪丸大小、睪丸製造精子能力之外，也會因為年齡增加、精液採集頻率、精液採集方法、飼養管理、季節等不同因素而有差異（Arthur *et al.*, 1989; Stockner and Bardwick, 1996）。

#### （五）死活精子比例

精液之精子死活比例可依據細胞膜完整性原理，利用伊紅-苯胺黑（eosin-nigrosin）染色法來評估。先將染色劑滴在載玻片上，再滴少量精液上去，蓋上另一片載玻片，吸去多餘染色劑，再將兩片載玻片分開，分別置於加熱板上烘乾，最後於顯微鏡高倍數鏡頭下分辨死活。若精子細胞膜完整時，帶正電之伊紅染色劑因與細胞膜之正電相斥而無法進入細胞內，因此，存活精子以顯微鏡觀察時呈現白色；若精子細胞膜破損時，伊紅染色劑則可進入細胞膜內而與帶負電之DNA相吸引，因此，死亡精子以顯微鏡觀察時呈現紅色或粉紅色。苯胺黑為對照染色劑，可提供與伊紅不同之藍紫色以便於區別（England and Ponzio, 1996）。

精液之精子死活比例評估，不僅能推測生精作用是否正常、生精作用之老化程度，亦能輔助判斷精子之活力，以提供更精確之生育力評估（Arthur *et al.*, 1989）。

#### （六）異常精子比例

由精子外觀判定異常精子比例。一般而言，精子型態檢查主要區分為三個部分，頭部、中片與尾部。

滴 2-3 滴生理食鹽水於乾淨之載玻片上，再滴一滴精液使之混合，上蓋另一片載玻片而使均勻分散，置於空氣中乾燥，利用位相差



顯微鏡觀察精子形態。利用 Rose-Bengal、伊紅-苯胺黑或甲苯胺藍 (Toluidine blue) 等染色劑染色。先將染色劑滴在載玻片上，再滴少量精液上去，蓋上另一片載玻片，吸去多餘染色劑，再將兩片載玻片分開，分別置於加熱板上烘乾，最後於顯微鏡高倍數鏡頭下觀察精子型態 (Arthur *et al.*, 1989)。

除以上所述精液檢查之項目與方法之外，另有多種評估精液品質之方式，如冷休克、精子之糖分解反應、精子之呼吸、美藍還原作用、精子之頭巾完整性、精子胞膜助孕素接受體暴露率檢查、電子顯微鏡觀察精子顯微構造等 (吳, 1992)。

#### 四、精液冷凍保存

精液冷凍保存之目的為，長期保存優良雄畜之遺傳物質，並調節母畜授精之需求。因此，對於現場工作之方便具有莫大助益。

在精液保存過程中，必須確保精子之存活率與授精能力都能夠維持，所以在進行精子保存時，必須注意會影響精子性狀之因素 (Cupps, 1990) 有許多因素影響精液冷凍保存過程之成功與否，Hunter (1980) 總結如下：1. 懸浮介質 (即稀釋液) 與細胞濃度。2. 適當之抗凍劑 (cryoprotective agent)。3. 抗凍劑在介質中之濃度。4. 平衡之時間與溫度。5. 降溫曲線之特性 (即形狀與速率)。6. 解凍曲線之特性。7. 特殊解凍介質之使用。8. 抗凍劑移除之方法 (如稀釋或透析)。

##### (一) 稀釋液

稀釋液所提供之功能包括：1. 增加體積；2. 載運精子；3. 提供精子冷凍前所需之能量物質；4. 於精子冷藏、冷凍與解凍過程中，減低溫度變化所造成之傷害；5. 提供精子等張之環境，避免滲透壓改變之危害；6. 具有緩衝能力，以中和精子代謝產物 (乳酸)，降低

酸鹼度變化之損害；7. 減少微生物所造成之影響等 ( Bearden and Fuquay, 1997; Hafez, 2000 )。

為達到上述功能，稀釋液除含有水分之外，尚有下列成分：

1. 蛋黃、脫脂乳粉、或兩者

精子在降溫過程中會遭受相當程度之傷害，其細胞內鉀離子、酵素、脂蛋白與 ATP 會散失至細胞外，此種現象稱之為冷休克 ( cold shock ) ( Salisbury *et al.*, 1978 )。蛋黃與脫脂乳粉中有許多大分子物質，如蛋白質、卵磷脂、脂蛋白等，此等大分子物質可以保護精子免於受溫度下降時所造成冷休克之危害，而其中以脂蛋白之保護效果最佳 ( Watson, 1979 )。然而，某些蛋黃成分對某些物種之精子有毒，例如山羊之精漿成分與蛋黃可發生毒性交互作用而導致精子死亡。全乳也對精子有毒，因含有一種蛋白質-lactenin，可殺死精子，故以牛乳作為精液稀釋時，必須被加熱以使此毒性因子不活化 ( Parkinson, 2001 )。

2. Tris salt、磷酸鹽、碳酸鹽、檸檬酸鹽等緩衝系統

一般家畜精液之 pH 皆在微酸至微鹼範圍內 ( pH5.9~7.9 ) ( Bearden and Fuquay, 1997; Edqvist and Stabenfeldt, 1993; Garner and Hafez, 2000 )，但精子在冷凍之前，即使在冷藏溫度下，也會代謝產生乳酸，而使精液之 pH 發生變化。早期之研究顯示磷酸鹽或檸檬酸鹽所緩衝之稀釋液，其最適 pH 值為 7.0~7.2，而後來一致認為在 Tris 緩衝液中，牛之精液在 pH 6.5 可得最高之受精力 ( Watson, 1979 )。

在精液只被冷卻而不冷凍時，緩衝尤其重要，因為已冷卻之精子仍有代謝活動 ( Salisbury *et al.*, 1978 )。最常用之緩衝系統為 2.9~3.2 % trisodium citrate dihydrate 以 citric acid 調整至 pH 6.9。磷酸鹽緩衝系統 ( 含 2.0%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  及 0.2%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ) 亦曾被使用於精

液稀釋液，但因會導致精子發生頭對頭凝集作用（head-to-head agglutination），而少被使用（Bearden and Fuquay, 1997; Parkinson, 2001）。最近，有多種有機緩衝物亦已被使用，例如 Tris、Tricine、TES、HEPES 等，其中以 Tris 被使用地較為廣泛（Parkinson, 2001; Watson, 1979）。上述緩衝劑同時亦貢獻稀釋液之滲透壓。

### 3. 能量來源

大部分稀釋液均提供能量受質給予精子。一般而言，單醣〔如葡萄糖、果糖、甘露糖（mannose）及阿拉伯糖（arabinose）〕為合適之受質，但個別糖類被代謝之速率則有種間差異。存在於以牛乳為基礎之稀釋液之乳糖，並不能被代謝（Parkinson, 2001）。可以理解者，在精液冷藏時，稀釋液之能量受質較重要，而在精液冷凍保存時，較不重要。同時值得注意者，能量受質亦提供稀釋液滲透壓。

### 4. 溶質

溶質賦予稀釋液滲透壓。在一般稀釋液中，緩衝鹽類、糖類、牛乳或蛋黃之蛋白質與其他溶質一起提供適當之滲透壓。家畜精漿之滲透壓約為 285 mOsm/L，而精子可忍受輕微之張性（tonicity）變異（Parkinson, 2001）。

高張稀釋液對精子之傷害較低張稀釋液為小，而且高張溶液可在凍結前減少細胞內之水含量，而減少細胞內冰晶形成之可能性，故大部分被推薦之冷凍精液稀釋液為高張溶液（Watson, 1979）。

### 5. 廣效或混合抗生素

精液一離開雄性體內，即暴露於微生物污染之危機中，為抑制致病性及無病原性微生物之生長，稀釋液常添加 penicillin streptomycin polymyxin B 或其他抗生素之組合（Hafez, 2000）。許多抗生素以及（尤其）某些抗黴菌劑對精子具有毒性（Bearden and Fuquay, 1997; Watson,

1979)，因此使用濃度有其限制。

## 6. 其他添加劑

為改善精子外在環境之理化特性，以及母畜生殖道之生理機能，以利於提高受精率，某些物質常被添加。例如，過氧化氫？（peroxidase）、 $\beta$ -澱粉？（ $\beta$ -glucuronidase）、催產素、前列腺素 E、維生素、ATP、精胺酸、Kallikrein、咖啡因（caffeine）……（Watson, 1979）。

## （二）稀釋倍率

精液之稀釋倍率因種別、精子濃度而有不同。通常在牛約 10~20 倍，在其他動物則稀釋倍率更低。過度稀釋對精子有害，此所謂“稀釋效應(dilution effect)”之特徵為：活動力與糖解作用活性(glycolytic activity)之喪失，可能抑制為細胞內成分之滲透或精漿保護物質之稀釋所致（Parkinson, 2001; Watson, 1979）。稀釋可能改變細胞膜性質，使之對冷凍解凍更加敏感，因此稀釋超過 30 倍之牛冷凍精液，其精子存活率通常較低（Watson, 1979）。

## （三）抗凍劑

為了讓精子在冷凍與解凍後尚能存活，稀釋液不僅需含有抵抗冷休克之物質，尚須含有抗凍劑（如甘油），以保護精子免於冷凍之危害。許多物質具有抗凍效果，可將之分為兩類：一類可穿過細胞膜，另一類則維持於細胞外。在冷凍精液中，穿透性抗凍劑中最常用者為甘油。其他穿透性抗凍劑〔如 DMSO 與多醇類（polyols）〕及非穿透性抗凍劑〔如各種糖類、蛋白質、polyvinyl pyrrolidone（PVP）〕也已被測試作為精子抗凍劑之效果，但皆不如甘油（Watson, 1979）。

抗凍劑藉著與水結合而發揮作用，因此可改變脫水與冰晶形成之

可資利用水分含量 ( Parkinson, 2001 )。 穿透性抗凍劑不僅因減少水自細胞喪失而減少溶質傷害，亦與水結合，使之不能被用以形成冰晶，而減少細胞內冰晶之形成。 非穿透性抗凍劑可在迅速冷卻中加速脫水，因而使細胞內冰晶之形成達到最少 ( Parkinson, 2001 )。

甘油為用於製作哺乳動物冷凍精液最主要之抗凍劑，但對精子亦具有直接之毒性 ( Watson, 1979 )。 甘油之最適濃度視種別與稀釋液之其他成分而定。 例如，含有雙醣之牛隻精液稀釋液可使用較低濃度之甘油 ( 3~4% )，而不含雙醣之稀釋液則使用較高濃度之甘油 ( 至少 7% ) ( Unal *et al.*, 1978 )。 在鹿科動物，以 5~10% 甘油作抗凍劑，皆可獲得具有解凍後存活率可接受之冷凍精液 ( Asher *et al.*, 2000 )

雖然添加甘油之溫度是否影響其毒性尚有爭論 ( Watson, 1979 )，但一般建議在 4~5 時添加 ( Bearden and Fuquay, 1997; Hafez, 2000 )。 添加甘油之速率對精子存活之影響亦有爭議 ( Watson, 1979 )，但在實際應用上通常建議緩慢添加或分步驟添加含有甘油之稀釋液 ( Bearden and Fuquay, 1997 )。

精液在加入含有抗凍劑稀釋液之後，而於冷凍之前需要一段平衡時間，其目的為使抗凍劑能充分發揮作用。 平衡時間之長短，是否影響精液冷凍保存之成敗亦有爭論，但一般建議平衡時間至少 4 小時 ( Bearden and Fuquay, 1997; Hafez, 2000; Watson, 1979 )。

#### (四) 冷卻、冷凍與解凍速率

冷卻精子對細胞造成明顯傷害，導致細胞內之鉀、酵素、脂蛋白與 ATP 之滲漏 ( Salisbury *et al.*, 1978 )。 此種冷休克之現象可被快速冷卻速率所擴大 ( Parkinson, 2001 )，因此冷卻速率不宜太快。 一般預先稀釋之溫精液降溫至 5℃，應費時 2~4 小時 ( Bearden and Fuquay,

1997)。

在製作冷凍精液時，冷凍速率對精子存活有甚大影響。當稀釋液溫度下降至凍結點以下時，純水之冰晶開始形成，稀釋液未凍結部份之溶質濃度上升，滲透壓亦隨之上升。在此階段中，因有細胞膜之阻隔，冰晶並未延伸進入細胞，故細胞內成分歷經一段超冷卻 (supercooling) 時期。在此階段細胞因滲透而喪失水分至細胞外介質，直至細胞內形成冰晶。在凍結階段中，對細胞之傷害有兩種方式。在有明顯程度之細胞脫水發生時，殘餘在細胞內水分中之高濃度溶質可能有害，而若脫水輕微，則在細胞內形成大冰晶，而造成內部與膜之物理性傷害。兩者對細胞之影響視冷卻速率而定：速率越慢，脫水越多；速率越快，冰晶形成所致之傷害越大 (Parkinson, 2001; Watson, 1979)。因此，最適當之降溫速率為此兩種效果間之折衷。而此一最適當之降溫速率隨細胞形式而異，例如骨髓幹細胞為 1 / min，而人類紅血球為 300 / min (Watson, 1979)。另外，細胞大小也影響上述兩種效應之相對程度，一般而言，細胞越大，脫水越慢 (Parkinson, 2001)，因此最適降溫速率將較慢。

在冷凍精液之降溫方式常用者有下列幾種：1. 置於玻璃 ampoule 之已稀釋精液，被置入乾冰與酒精混合物中 (-79 ) 凍結；2. 已稀釋之精液滴在乾冰上凍結成顆粒；3. 置入 0.25 ml 或 0.5 ml 塑膠麥管之精液，懸於液態氮蒸氣中 (約-120 ) 10 分鐘，再浸入液態氮中；4. 利用具有程式規劃之冷凍器降溫 (Parkinson, 2001)。

精液之解凍亦須快速；緩慢解凍將使細胞內再形成冰晶，而傷害膜。在實際應用中，解凍速率甚少成為關鍵，以 0.25 ml 麥管而言，在 0~40 水中解凍皆可得良好結果 (Parkinson, 2001)。冷凍精子在解凍後之存活時間不如未冷凍者，並且對溫度變化較敏感 (Hafez,

2000; Parkinson, 2001 )，因此冷凍解凍後應儘可能避免溫度之變化。

### (五) 鹿隻精液冷凍保存之實例

1. Jacobson *et al.* ( 1989 ) 敘述白尾鹿冷凍精液之製作方法如下：

稱取 3.028 g tris salt 與 1 g 果糖，加入 75~85 ml 蒸餾水溶解，以 20% 檸檬酸溶液調整酸鹼度到 pH 6.8。將液體加熱到 98~100 °C、5 分鐘消毒，倒入滅菌過之 100 ml 量瓶，加蒸餾水至 100 ml。甘油緩衝液之製備一如上述，但在消毒之後，讓緩衝液於量瓶內冷卻，然後加入 17.5 ml 甘油，最後才加蒸餾水至最後容積。

Tris-蛋黃稀釋液製備如下：將 20 ml 個別緩衝液（添加甘油或不添加甘油）置入 25 ml 量筒，加入 penicillin G 25000 IU 與 dihydrostreptomycin 25000 µg，並以新鮮蛋黃加到 25 ml。

精液被收集於 2 ml 不添加甘油之稀釋液中（已預溫至 35 °C）。含有預先稀釋精液之試管，置於內含 30% 甘油之 500 ml 燒杯中，並置於 5 °C，冷卻 3 小時。等量之甘油緩衝液（已預冷至 5 °C）即以 15 分鐘之間隔時間，逐次（分別加入 10%、20%、30% 與 40%）將之添加入已冷卻之稀釋精液，最終產生含有 50% 甘油稀釋液之混合物（甘油最終濃度為 7%）。添加甘油稀釋液之後，平衡 12 小時，然後裝入 0.5 ml 麥管中。麥管在 5 °C，以 polyvinyl alcohol 粉末封口。單層麥管被置於網盤上，移入液態氮貯存桶，於液態氮液面上 5 cm，待凍結後，放在附著鋁罐之杯子內，浸入液態氮內。

解凍時，精液在 32~35 °C 水浴中解凍 45 秒，擦乾後，插入人工授精槍中使用。

以此方式，作者獲得 50~100% 之母鹿受孕率。

### 2. 鹿冷凍精液之製作

Asher *et al.* ( 1988a ) 以含 2.9% sodium citrate，20% 蛋黃之稀

釋液（以 8% 甘油為抗凍劑）將？鹿精液稀釋至每毫升含  $200 \times 10^6$  個運動精子，在  $4^\circ\text{C}$  平衡 4 小時，裝入 0.5 ml 麥管（每麥管含  $100 \times 10^6$  個精子），在可程式規劃冷凍器內於液態氮蒸氣中冷凍至  $-125^\circ\text{C}$ （降溫速率  $6^\circ\text{C}/\text{min}$ ），然後移入液態氮中，直至使用。使用前，麥管於  $37^\circ\text{C}$  水浴中解凍。解凍後之精液進行陰道內授精後，獲得 64.5% 受孕率；而在子宮內授精則得 47.3% 受孕率。同一報告中，新鮮精液在陰道內授精後之受孕率為 65.4%。

Asher *et al.*（1990）以相同方式製作？鹿（*Dama dama dama* × *Dama dama mesopotamica*）之冷凍精液，以含  $25 \sim 50 \times 10^6$  個精子之冷凍精液進行牝？鹿之子宮內授精，獲得 67.7% 受孕率。

Jabbour *et al.*（1993）在？鹿亦以相同稀釋液，稀釋精液至每毫升含  $400 \times 10^6$  個精子，裝入 0.25 ml 麥管，以相同方式冷凍與解凍。解凍後活動力  $>70\%$  方被用於授精。以此冷凍解凍精液在發情同期化母鹿進行子宮頸授精，獲得 62.9% 之受孕率，而同一報告中，新鮮精液之受孕率為 76.3%。

3. Fennessy *et al.*（1990）敘述紅鹿冷凍精液製作之方法及成果如下：

電刺激採得精液後，保持於  $30^\circ\text{C}$ ，以等量稀釋液〔含 84 ml 2.9% sodium citrate，3.0 g D-glucose，15 ml 新鮮蛋黃，1 ml 抗生素溶液（含 0.1 g streptomycin sulphate）〕稀釋，再以含抗凍劑之稀釋液（含 69 ml 2.9% sodium citrate，16 ml Analar glycerol，15 ml 新鮮蛋黃）稀釋至  $200 \sim 280 \times 10^6$  個精子/ml。在 2~4 小時中冷卻至  $4^\circ\text{C}$  後，將精液裝入 0.25 ml 麥管，於  $-80^\circ\text{C}$  液態氮蒸氣中緩慢冷凍 8~9 分鐘。解凍後，在子宮內授精、陰道內雙次授精與陰道內單次授精之受孕率分別為 56%、53% 與 35%。



4. Monfort *et al.* (1993a) 敘述坡鹿冷凍精液製作之方法與成果如下：

電刺激採得精液後，以 BF5F 稀釋液（含 20% 蛋黃，1.6% 葡萄糖，1.6% 果糖，1.2% Tes，0.2% Tris，1000 IU penicillin G/ml，1000 $\mu$ g streptomycin sulfate/ml，與 0.5% sodium and triethanolamine lauryl sulfate 之表面作用劑混合物）稀釋，暫時維持於 37 $^{\circ}$ C，然後置入隔水容器（25 $^{\circ}$ C），並冷卻 1 小時至 4 $^{\circ}$ C，然後進一步以預冷（4 $^{\circ}$ C）之含 16% 甘油之 BF5F，以 1:1，分三步驟稀釋（最後甘油濃度為 8%）。然後吸入 0.5 ml 麥管，密封並維持於 4 $^{\circ}$ C、1 小時，麥管置於乾冰磚（-78 $^{\circ}$ C）上 10 分鐘，再移入液態氮（-196 $^{\circ}$ C）中，貯存 1~6 個月。使用前在 37 $^{\circ}$ C 水浴中解凍 20 秒。冷凍、解凍後之精液進行子宮內授精（每側子宮角 7.5~10 $\times$ 10<sup>6</sup> 個有運動力精子）後，20 頭牝鹿中有 9 頭懷孕且產下仔鹿。

## 肆、材料與方法

### 一、試驗動物之飼養與管理

選擇健康、性成熟之牡台灣水鹿 5 頭，體重介於 90~140 kg。在試驗期間，暴露於自然光照下。在試驗期間，每日提供盤固拉乾草及清潔飲水，任由鹿隻食用與飲用，並補充每頭鹿隻 500 g 精料（粗蛋白 18% 之福壽牌泌乳牛飼料）及約 1 kg 之苜蓿粒。

### 二、血液與精液樣本之採集

自 2000 年 2 月 21 日起，至 2001 年 3 月 2 日止，每隔二週，採集各受試鹿隻之血液與精液樣本一次。

血液樣本採集時，以人力方式保定鹿隻，自頸靜脈採集各受試鹿隻之血液樣本，以便分析血清中之睪固酮含量。所有血液樣本之採集工作，皆在開始捕捉後 5 分鐘內完成。血液樣本在室溫下靜置 2~3 小時，待血液凝固後，再於 4℃ 下冷藏過夜，翌晨於 1500 ×g 下，離心 15 分鐘。將分離所得之血清保存於 -20℃ 下，直至進行睪固酮之放射性免疫鑑定（radioimmunoassay; RIA）。為避免睪固酮之一日內變化所可能導致之影響，每次血液樣本之採集均固定於 16:00~17:30 進行。

血液樣本採集完畢之後，隨即進行精液樣本之採集（修正自 Haigh *et al.*, 1984）。將電擊棒塗抹潤滑劑以利插入直腸。插入後，先通予低電壓（100 V）瞬間（約 1~2 秒）之電流，使陰莖勃起而易於推出包皮口外，再以消毒水清洗包皮腔與尿道開口。間歇性連續給予高電壓、長時間之電流（300 V，通電 10~20 秒休息 5 秒），配合滅菌漏斗與離心管收集精液，直至有射精動作而無精液射出時即停止精液樣本

之採集。所有血液與精液樣本之採集工作，皆在開始捕捉後 15 分鐘內完成。精液樣本立即置於 37℃ 之恆溫水浴內，等待精液檢查。

### 三、精液性狀檢查

#### (一) 精液量與外觀顏色

以滅菌過之漏斗與有刻度離心管收集牡台灣水鹿精液，並記錄精液量，且觀察精液所呈現之顏色與透明度。

#### (二) 精子活力之判定

將一滴混合均勻之原精液（精液輕輕轉動 2~3 次）滴於載玻片上，蓋上蓋玻片，立即以低倍數顯微鏡觀察精子活動，並略估活動精子百分率與活動力。精子活力以 0~5 級評估（吳，1992）。

5 級：精子活力極好，80% 以上的精子活力良好；精子之旋渦運動快速而明顯。

4 級：精子活力很好，70~80% 的精子活力良好；精子之旋渦運動很快，但較 5 級稍差。

3 級：精子活力好，50~70% 的精子活力好，但由顯微鏡視野所見之旋渦運動緩慢。

2 級：活力平常，約 20~50% 的精子有活力，沒有旋渦運動形成。

1 級：活力差，低於 20% 的精子有活力，且泳動緩慢而不前進。

0 級：無活力可辨別。

#### (三) 精子濃度計數

原精液以 1% NaCl 溶液稀釋，置於紅血球計數盤上，蓋上蓋玻片，以高倍（400x）光學顯微鏡計算五大格之精子數目，將此數目除以 5，乘以稀釋倍數（200x）再乘以 10000，即為精子濃度（單位：sperm/ml）。

#### （四）死活精子比例

利用死亡之精子會吸收染色劑而呈藍色，活精子不吸收染色劑而未被染色為依據，逢機計算 333 隻精子，死精子數 $\times 3/10 =$ 死精子%。

染色劑之配製法如下：

Sodium citrate 3.6 g

Eosin 1.6 g

Nigrosin 6 g

加 Distilled water 至 100 ml

將染色劑滴於載玻片上，滴入相同體積之精液混合，上蓋另一片載玻片，去除多餘之染色劑，再將兩片載玻片分開，蓋上蓋玻片，待玻片乾燥後，以高倍光學顯微鏡計數。

#### （五）異常精子比例

由精子的外觀判定是否異常。逢機計算 333 隻精子，異常精子數 $\times 3/10 =$ 異常精子%。

染色劑之配製法如下：

Rose Bengal 3 g

Distilled water 99 ml

40% 福馬林 1 ml

將染色劑滴於載玻片上，滴入相同體積之精液混合，上蓋另一片載玻片，去除多餘之染色劑，再將兩片載玻片分開，蓋上蓋玻片，待

玻片乾燥後，以高倍光學顯微鏡計數。

#### 四、冷凍精液之製備流程

精液冷凍保存之方法，係以 Jacobson *et al.* (1989) 所述者為基本，進行各項冷凍精液製作變因之調整測試。冷凍精液製作之流程如下所述：

精液被收集於 2 ml 不添加抗凍劑之稀釋液中（已預溫至 35~37℃）。以顯微鏡評估精子濃度，據以正確稀釋精液。稀釋時，將精液緩慢加入預溫之稀釋液（測試項目）中，然後置於內含 30% 水之 500 ml 燒杯中，並連同燒杯在 5℃ 冷卻三小時。等量之含抗凍劑（抗凍劑種類與濃度為測試項目）緩衝液（已預冷至 5℃）即以 15 分鐘之間隔時間，逐次（分別加入 10%、20%、30% 與 40%）將之添加入已冷卻之稀釋精液，最終產生含有抗凍劑稀釋液之最後混合物，此時精子濃度為  $5 \times 10^7 / \text{ml}$ 。添加抗凍劑稀釋液之後，平衡一段時間（測試項目），然後裝入 0.5 ml 麥管中。麥管在 5℃，以 polyvinyl alcohol 粉末封口。單層麥管被置於網盤上，移入液態氮貯存桶，先置於液態氮液面上 5 cm，待凍結後，再放在附著鋁罐之杯子內，浸入液態氮內。

#### 五、冷凍精液製作之測試項目

##### （一）稀釋液種類

本研究中所測試之稀釋液包括 Tris-蛋黃稀釋液、Tris-檸檬酸-蛋黃稀釋液及檸檬酸鈉-蛋黃稀釋液等三種。

在本試驗中，以 7% 甘油（最終濃度）為抗凍劑，並在 5℃ 平衡 12 小時。各種稀釋液之配方如下所述：

1. Tris-蛋黃稀釋液 (Jacobson *et al.*, 1989)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 3.028 g  
Fructose 1 g  
Egg yolk 25 ml  
Penicillin G 25000 IU  
Dihydrostreptomycin 25000 µg  
以 20% Citrate acid 溶液調整 pH 值至 6.8  
加蒸餾水至 100 ml

2. Tris-檸檬酸-蛋黃稀釋液 ( Evans and Maxwell, 1987 )

Tris (hydroxymethyl) aminomethane 3.63 g  
Fructose 0.5 g  
Citric acid 1.99 g  
Egg yolk 15 ml  
Penicillin G (sodium salt) 0.06 g  
Streptomycin sulphate 0.1 g  
加蒸餾水至 100 ml

3. 檸檬酸鈉-蛋黃稀釋液 ( Krzywinski and Jaczewski, 1978 )

2.9% Sodium citrate 72 ml  
Fructose 1.25 g  
Streptomycin sulphate 0.1 g  
Egg yolk 20 ml  
加蒸餾水至 100 ml

(二) 抗凍劑種類

本研究中所測試之抗凍劑種類包括甘油與 DMSO, 而本試驗所使用之最後濃度為 7% , 並在 5 平衡 12 小時, 而所用稀釋液為 Tris-蛋黃稀釋液。

### (三) 平衡時間

本研究中測試添加甘油稀釋液後在 5 之平衡時間, 包括 8、10、12、14 與 16 小時。在本試驗中, 所使用之稀釋液為 Tris-蛋黃稀釋液, 抗凍劑為 7% 甘油。

### (四) 甘油濃度

本研究中測試甘油之最終濃度包括: 5%、6%、7%、8% 與 9%。在本試驗中, 所使用之稀釋液為 Tris-蛋黃稀釋液, 並在加入甘油稀釋液後平衡 12 小時。

## 五、冷凍精液之解凍

冷凍精液麥管置於 32~35 恆溫水浴中, 解凍 45 秒。解凍後精液置於 37 恆溫水浴中, 等待精液檢查。

## 六、血清中睪固酮含量之分析

所用抗血清為兔抗 Testosterone-7 $\alpha$ -carboxymethyl-thioether-bovine serum albumin 之抗血清 (Sigma)。氙標幟睪固酮 (1,2,6,7-<sup>3</sup>H-testosterone) 購自 New England Nuclear。RIA 之步驟簡述如下。

1. 標準曲線: 分別取 0、15.6、31.2、62.5、125、250、500pg 睪固酮標準溶液, 置入培養管內, 於 40、真空烘箱內, 將 Tris-HCl buffer 吹乾。
2. 萃取: 每一樣本皆進行二重複之測定, 每次吸取 100  $\mu$ l 血清樣本 (同一鹿隻之樣本安排於同一鑑定中) 置入萃尿管內, 加入 3ml 乙醚。混合後, 震盪 30 分鐘。再於 4、1500 g 下, 離心 15 分鐘, 置入低溫迴流裝置中, 待水層凍結後, 將乙醚層倒入培養管中, 置入 40、真空烘箱內, 將乙醚吹乾。

3. 回收率測定：將盛有約 2000 cpm 之氚標幟睪固酮 ( 1,2,6,7-<sup>3</sup>H-testosterone )之萃取管,置入 40 ℃ 真空烘箱內烘乾,然後加入 100μl 血清,混合後靜置 1 小時以上,然後與樣品相同步驟進行萃取。萃取後,倒入計數瓶 ( counting vial ) 中吹乾,計數,以計算回收率。
4. 於所有培養管中加入 0.5ml 抗血清,混合之。於室溫中,靜置 30 分鐘。
5. 於培養管中加入 0.1 ml 標幟睪固酮 ( 約 10,000 cpm ), 混合之。於 37 ℃ 中,靜置 1 小時。
6. 將培養管置入 4 ℃ 水浴中,冷卻 15 分鐘。
7. 於 4 ℃ 水浴中,快速加入 0.2ml 已預冷之 dextran coated charcoal suspension( dextran 0.025%、 charcoal 0.25% ), 混合之。於冰水中,靜置 10 分鐘,再於 4 ℃、1500g 下,離心 10 分鐘。
8. 將上層澄清液到入計數瓶 ( counting vial ) 內,並加入 6ml 計數溶液 ( Ecolume, ICN ), 混合後,靜置 4 小時以上。
9. 將上述製備之計數瓶,置入液態閃爍計數器 ( liquid scintillation counter ) 中計數之,並根據標準曲線,求出各血液樣本中之睪固酮含量。

本試驗中,標幟睪固酮之回收率 ( hot recovery rate ) 為 90.1±1.6 % ( Mean±SD; n=5 )。

RIA 之鑑定靈敏度 ( sensitivity ): 以零標準溶液之結合率平均值,減去二個標準偏差 ( SD ), 求出本研究中睪固酮 RIA 之靈敏度為 16 pg/tube, 亦即以 100μl 樣本測定時,可測出之最低濃度為 160 pg/ml。

RIA 之鑑定精確度：睪固酮濃度平均為 6 ng/ml 之混合血清,其鑑定內變異係數 ( CV of intraassay ) 為 6.8% ( n=5 )。睪固酮平均濃



度為 7 ng/ml 之混合血清，其鑑定間變異係數 ( CV of interassay ) 為 14.4% ( n=4 )。

依抗血清提供廠商之說明書敘述，所用抗血清與測試類固醇之相對作用力 ( Relative activity=ng testosterone at 50% bound/ng steroid at 50% bound ) 如下：5a-androstane-3a, 17 $\beta$ -diol, 0.6% ; 5a-androstane-3 $\beta$ , 17 $\beta$ -diol, 1.3% ; 5a-androstane-3, 17-dione, 0.5% ; 5 $\beta$ -androstane-3,17-dione, 0.3% ; 5a-androstane-3 $\beta$ , 11 $\beta$ , 17 $\beta$ -triol, <0.1% ; andro- stenedione, 1.7 ; cortisol, <0.1% ; dehydroepiandrosterone, 0.2% ; 5a-dihydro-testosterone, 23.0% ; 5 $\beta$ -dihydrotestosterone, 2.0% ; 17a- epitestosterone, 1.5% ; 17 $\beta$ -estradiol, <0.1% ; 3a-hydroxy-5a-androstan- 17-one, <0.1% ; 11 $\beta$ -hydroxytestosterone, 2.8% ; 11-oxotestosterone, 0.7% ; progesterone, <0.1%。

## 七、鹿角週期之觀察

隨時注意觀察，記錄鹿角脫落與茸毛完全脫落之日期 ( 以角基之皮膚完全磨淨，定義為蛻茸完成 )。

## 八、統計分析

所得數據以 SAS ( 2002 ) 之一般線性模式 ( GLM ) 程序，進行 t-test，檢驗兩組間之差異；或進行變方分析 ( ANOVA ) 測定組間差異，再以 LSD 比較兩兩間之差異。

表中各項數值均以 “ 平均 $\pm$ 標準機差 ( mean $\pm$ SEM ) ” 表示之。

## 伍、結果

### 一、血清中睪固酮含量之變化

一般而言，牡台灣水鹿血清中睪固酮含量在 2 月至 3 月之間維持於極低之水平( $< 0.2$  ng/ml)，自 4 月底或 5 月初起所有鹿隻之血清中睪固酮含量均一致地開始上升，但達到高峰之時間在各個體之間變異較大，約在 7 月至 12 月初之間達到高峰，甚至有些鹿隻可能出現兩個高峰。但各個體之血清中睪固酮含量，皆在達到高峰後，即迅速下降。在 12 月至 2 月之間，血清中睪固酮含量已相當低，但仍有小幅度之起伏(圖 1a)。就平均血清中睪固酮含量而言，2~4 月維持於最低水平，自 4 月開始上升，而於 10 月達到高峰，並在 12 月開始迅速下降(圖 1b)。

### 二、鹿角週期

牡台灣水鹿約每年完成一次鹿角週期。在本研究開始後，第一次牡鹿解角開始於 2 月 1 日，而於 3 月 18 日全部完成解角，平均解角日期為 2 月 29 日 $\pm 9$  日(mean $\pm$ SEM)。第一次蛻茸自 5 月 13 日開始，至 6 月 19 日全部完成蛻茸，平均蛻茸日期為 6 月 9 日 $\pm 6$  日。第二次解角自 1 月 28 日開始，至 2 月 16 日全部完成解角，平均解角日期為 2 月 6 日 $\pm 4$  日。兩次解角之時距為 328 日至 364 日，平均 343 $\pm 7$  日。第一次解角至蛻茸之時距(即為茸角期間)為 91 日至 127 日，平均 101 $\pm 6$  日。蛻茸至第二次解角之時距(即為硬角期間)為 231 日至 261 日，平均 242 $\pm 5$  日(表 1)。

本試驗中，牡台灣水鹿解角發生於血清中睪固酮含量下降至平均為 5.4 $\pm 0.3$  ng/ml 之時；而蛻茸發生於血清中睪固酮含量上升至平均

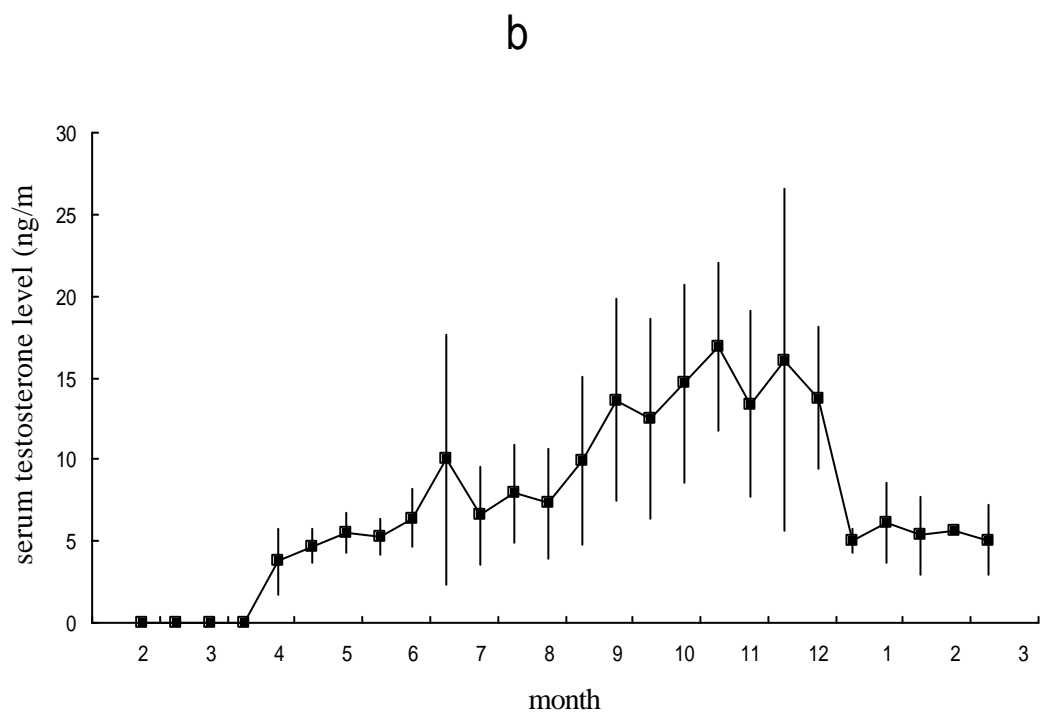
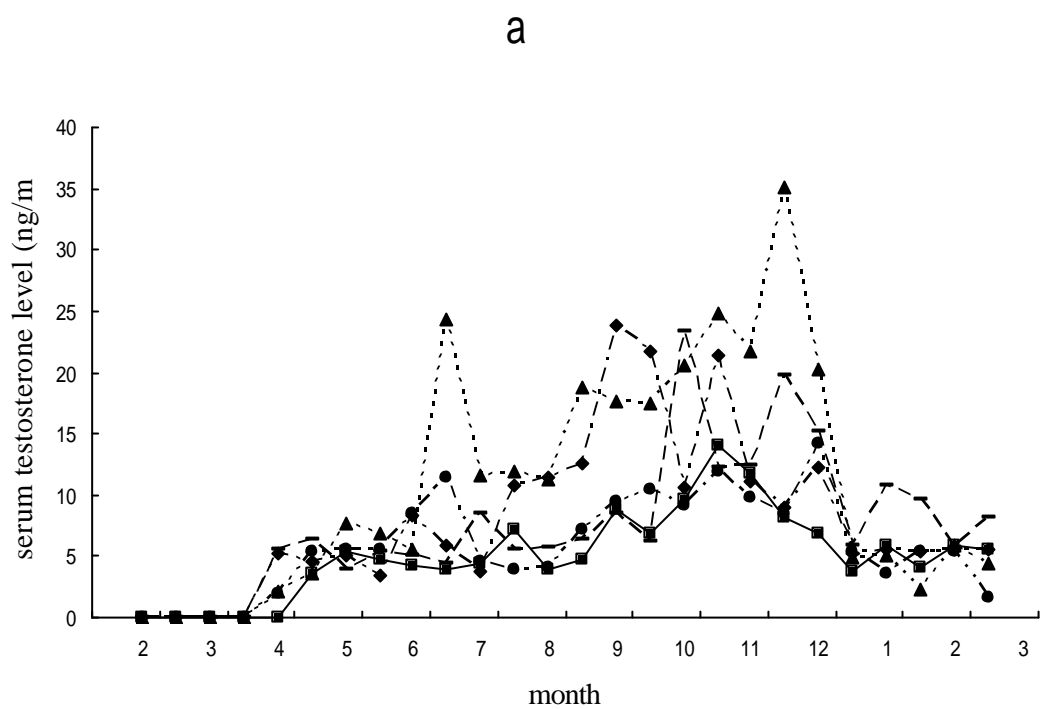


圖 1. 牡台灣水鹿血清中睪固酮含量之一年內變化。

a. 個別牡鹿；b. 5 頭牡鹿之平均。

Fig. 1. The annual changes in serum testosterone levels in Formosan sambar stags.

a. curves for individual stags; b. curve for means from 5 stags.

表 1. 牡台灣水鹿之鹿角週期

Table 1. Antler cycles of Formosan sambar stags

Traits	Range	Mean±SEM
Date of first cast	Feb 1~March 18	Feb 29±9 d
Date of first velvet shedding	May 13~June 19	June 9±6 d
Date of 2nd cast	Jan 18~Feb 16	Feb 6±4 d
Duration of velvet antler	91~127 d	101±6 d
Duration of bony antler	231~261 d	243±5 d

為  $5.8 \pm 0.6$  ng/ml 之時。

### 三、精液性狀之一年內變化

所有牡台灣水鹿在 2 月至 4 月間，皆未被採得精液，在 5 月與 1 月則各有 2 及 3 頭牡水鹿未被採得精液。

#### (一) 精液量

牡水鹿自 5 月開始方可採出精液，而精液量自 5 月份開始緩慢增加，於 9 月份達到高峰 ( $2.2 \pm 0.2$  ml)，隨後逐漸下降，至 2 月即全部採不出精液 (如圖 2 所示)。

#### (二) 精子活力

牡台灣水鹿精子之活力自 5 月份開始緩慢上升，於 7 月與 8 月之間迅速上升，而於 8 月份達到最佳狀態，之後即緩慢下降 (如圖 3 所示)。

#### (三) 精子濃度

精子濃度自 5 月份開始快速上升，於 8 月份達到最高精子濃度 ( $2.2 \pm 0.2 \times 10^9$ /ml)，之後即緩慢下降。在 6 月至 1 月之間，精子濃度維持於  $1.9 \sim 2.2 \times 10^9$ /ml (如圖 4 所示)。

#### (四) 死精子比例

牡台灣水鹿精液中之死精子比例，在剛可採得精液之 5~6 月份最高，自 7 月份起，開始迅速下降，而於 9 月份達到最低 ( $15.0 \pm 2.6\%$ )，隨後即開始上升 (如圖 5 所示)。

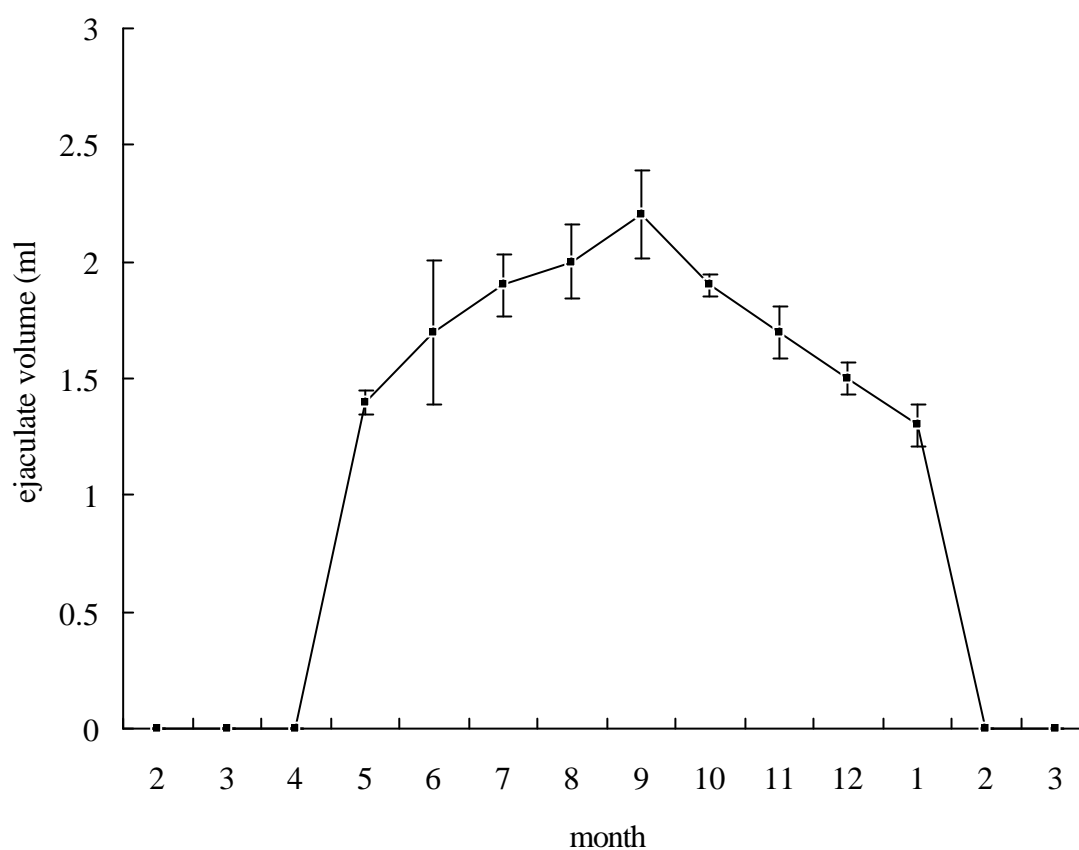


圖 2. 牡台灣水鹿精液量之一年內變化。2~4 月所有 5 頭牡水鹿皆未被採得精液，而 5 月與 1 月各有 2 及 3 頭牡水鹿未被採得精液。

Fig. 2. The annual changes in ejaculate volumes in Formosan sambar stags. All 5 stags didn't ejaculate during Feb. to Apr., and 2 and 3 stags didn't ejaculate in May and Jan., respectively.

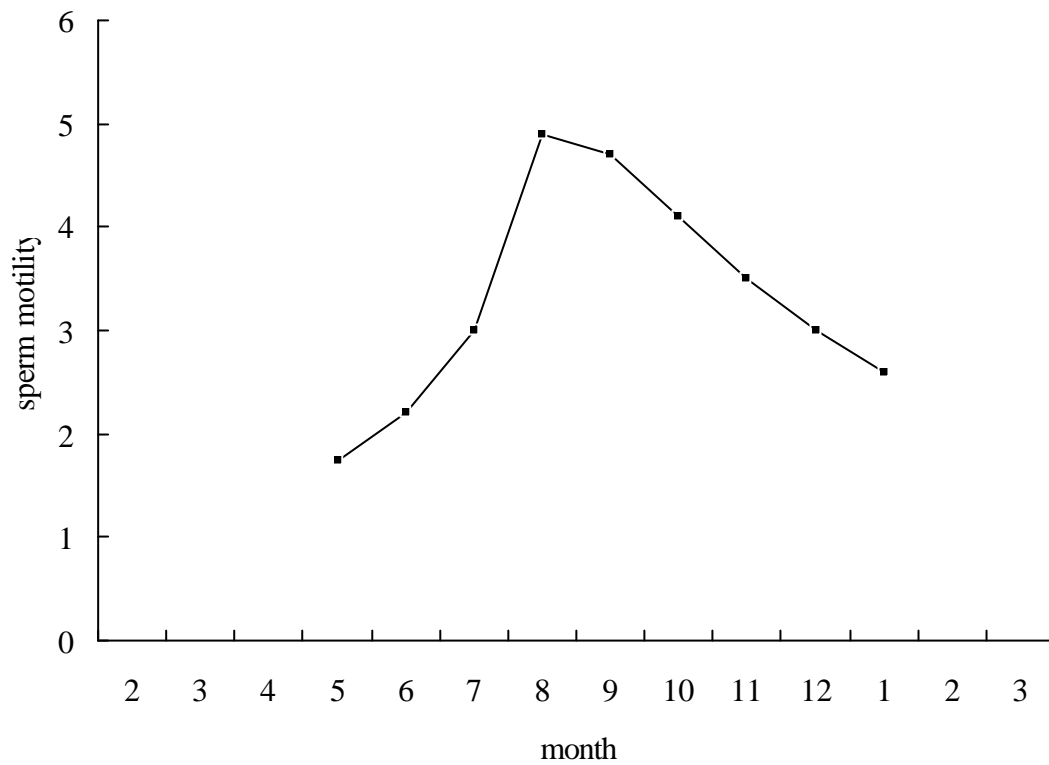


圖 3. 牡台灣水鹿精子活力之一年內變化。2~4 月所有 5 頭牡水鹿皆未被採得精液，而 5 月與 1 月各有 2 及 3 頭牡水鹿未被採得精液。

Fig. 3. The annual change in sperm motility in Formosan sambar stags. All 5 stags didn't ejaculate during Feb. to Apr., and 2 and 3 stags didn't ejaculate in May and Jan., respectively.

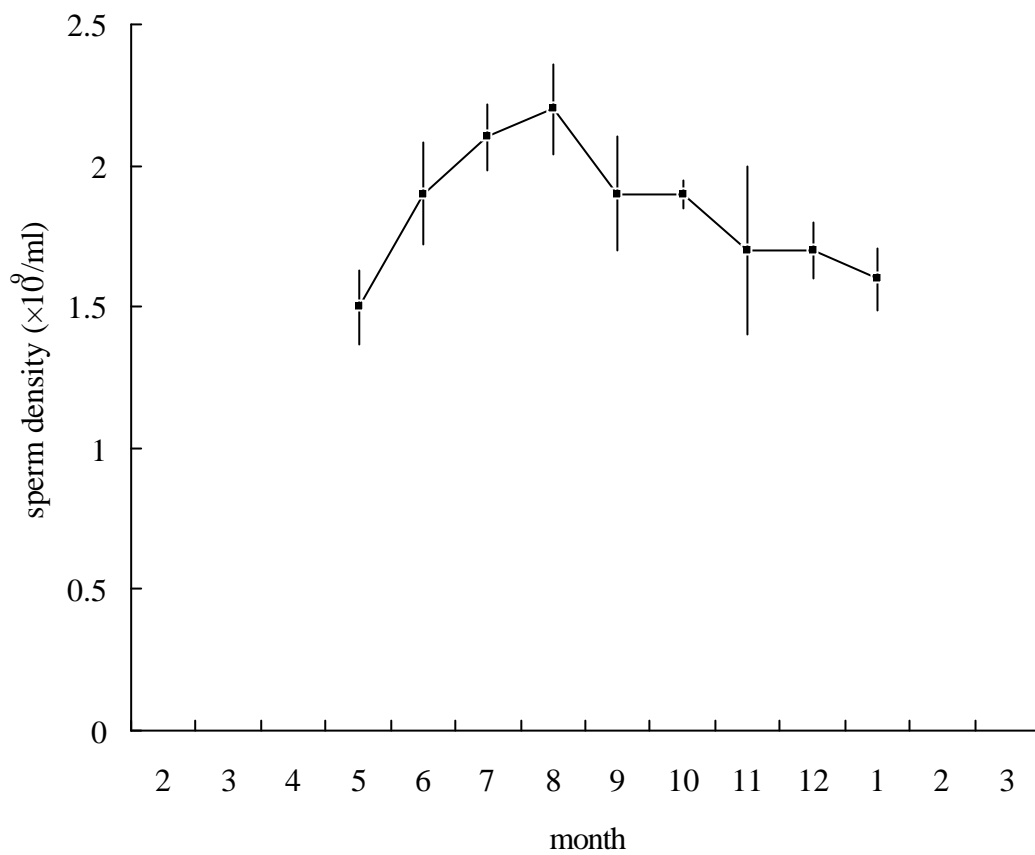


圖 4. 牡台灣水鹿精子濃度之一年內變化。2~4 月所有 5 頭牡水鹿皆未被採得精液，而 5 月與 1 月各有 2 及 3 頭牡水鹿未被採得精液。

Fig. 4. The annual change in sperm density in Formosan sambar stags. All 5 stags didn't ejaculate during Feb. to Apr., and 2 and 3 stags didn't ejaculate in May and Jan., respectively.



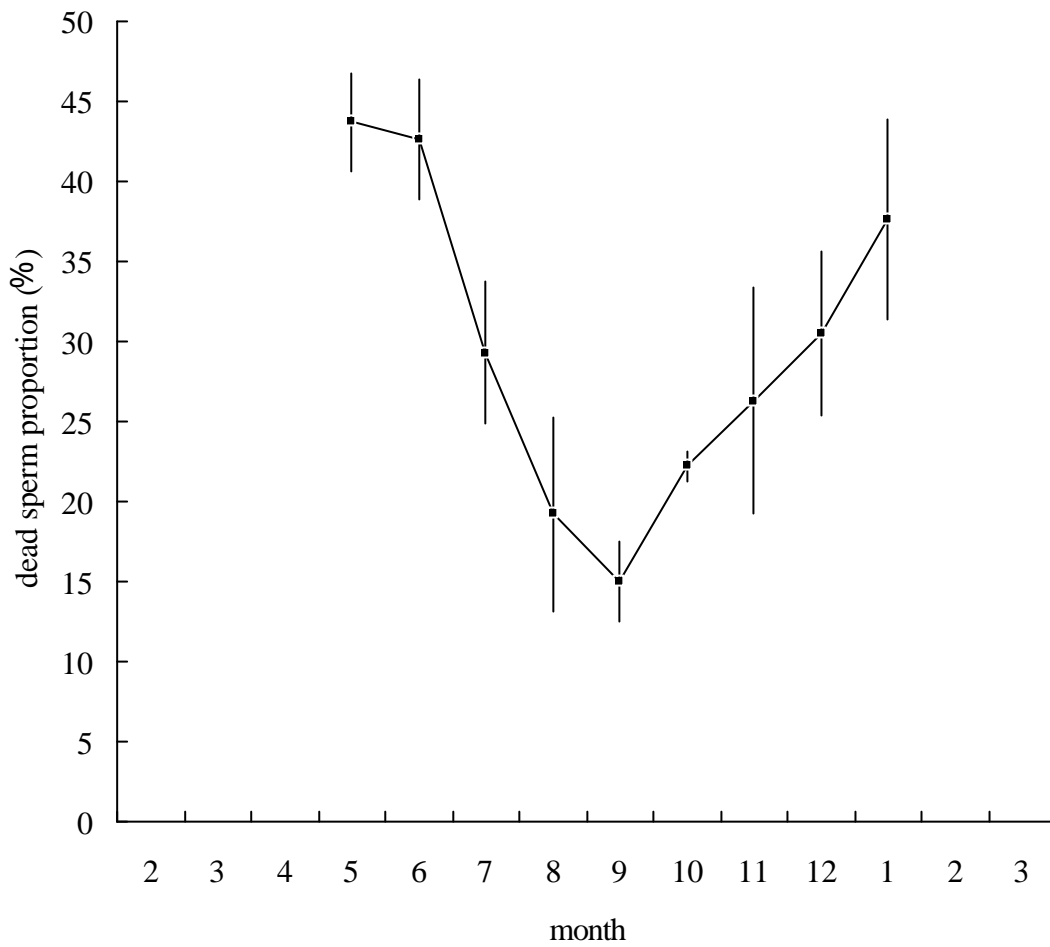


圖 5. 牡台灣水鹿死精子比例之一年內變化。2~4 月所有 5 頭牡水鹿皆未被採得精液，而 5 月與 1 月各有 2 及 3 頭牡水鹿未被採得精液。

Fig. 5. The annual change in dead sperm proportion in Formosan sambar stags. All 5 stags didn't ejaculate during Feb. to Apr., and 2 and 3 stags didn't ejaculate in May and Jan., respectively.

#### (五) 異常精子比例

異常精子之比例，其變化曲線與死精子比例者幾乎平行。牡台灣水鹿精液中之異常精子比例，於 5 月與 6 月份最高，自 7 月份起，開始迅速下降，而於 9 月份達到最低(  $16.3\pm 2.5\%$  )，隨後即開始上升( 如圖 6 所示 )。

### 四、精液冷凍保存

#### (一) 不同種類稀釋液

牡台灣水鹿精液應用 Tris-蛋黃稀釋液、Tris-檸檬酸-蛋黃稀釋液與檸檬酸鈉-蛋黃稀釋液冷凍保存，其製作過程中各階段( 加入不含抗凍劑稀釋液時 5 冷卻 3 小時 加入含抗凍劑稀釋液平衡 12 小時 液態氮保存 24 小時 ) 之精子存活率，在稀釋液間並無顯著差異 (  $P > 0.05$  ; 如表 2 所示 )。

#### (二) 不同種類抗凍劑

當 Tris-蛋黃稀釋液添加 7% 甘油或 DMSO 作為抗凍劑時，就加入含抗凍劑稀釋液平衡 12 小時之精子存活率而言，以甘油之保護效果顯著較 DMSO 者為佳 (  $71.8\pm 3.6\%$  vs  $69.6\pm 2.1\%$  ;  $P < 0.05$  )。就液態氮保存 24 小時後之精子存活率而言，甘油之保護效果亦顯著較 DMSO 者為佳 (  $67.7\pm 4.2\%$  vs  $64.4\pm 4.8\%$  ;  $P < 0.05$  ) ( 如表 3 所示 )。

#### (三) 不同平衡時間

以 Tris-蛋黃稀釋液添加 7% 甘油作為抗凍劑，測試加入含抗凍劑稀釋液後之最佳平衡時間 ( 8 小時、10 小時、12 小時、14 小時、16 小時 )，發現在平衡 12 小時後之精子存活率明顯較其它平衡時間者

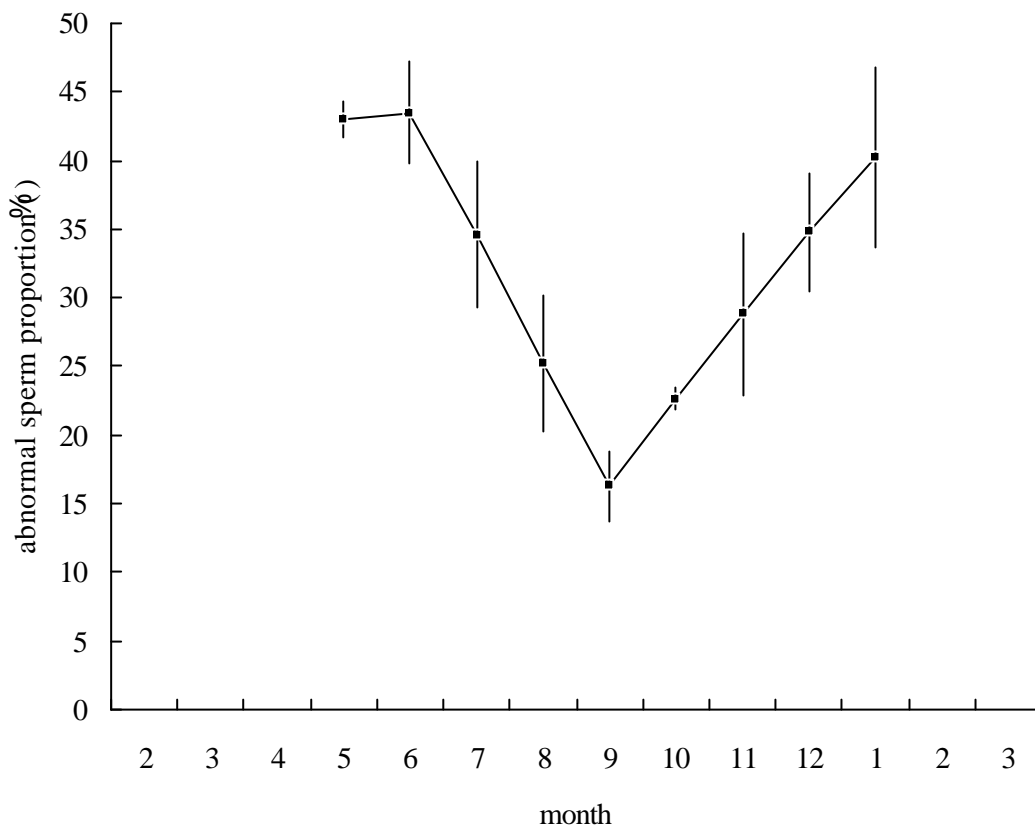


圖 6. 牡台灣水鹿異常精子之一年內變化。2~4 月所有 5 頭牡水鹿皆未被採得精液，而 5 月與 1 月各有 2 及 3 頭牡水鹿未被採得精液。

Fig. 6. The annual change in abnormal sperm proportion in Formosan sambar stags. All 5 stags didn't ejaculate during Feb. to Apr., and 2 and 3 stags didn't ejaculate in May and Jan., respectively.

為低 ( $P < 0.05$ ), 但在液態氮保存 24 小時後之精子存活率, 則組間無顯著差異 ( $P > 0.05$ ) (如表 4 所示)。

#### (四) 不同濃度抗凍劑

當 Tris-蛋黃稀釋液添加不同濃度 (最終濃度為 5%、6%、7%、8% 或 9%) 之甘油作為抗凍劑時, 在加入含抗凍劑稀釋液平衡 12 小時之精子存活率, 以 7% 者為最佳。在液態氮保存 24 小時之死精子百分率亦以 7% 者為最佳 (如表 5 所示)。

表 2. 稀釋液種類對水鹿精液冷凍保存過程中精子存活率之影響

Table 2. Effect of diluters on sperm survival rate during processing of semen freezing in sambar deer

Diluter*	Sperm survival rate evaluated at #			
	dilution with cryoprotectant free diluter	cooling at 5 for 3 hr	equilibrating for 12 hr following addition of cryoprotectan-containing diluter	24 hr after freezing
Tris-yolk	81.4	74.7	70.9	66.7
Tris-citric acid-yolk	79.8	75.4	71.2	65.5
Sodium citrate-yolk	80.4	75.3	69.6	66.1
SEM	0.38	0.18	0.40	0.26

\* The cryoprotectant was 7% glycerol in this trial.

# There is no significant difference among diluters ( $P>0.05$ ).

表 3. 抗凍劑種類對水鹿精液冷凍保存過程中精子存活率之影響

Table 3. Effect of cryoprotective agents on sperm survival rate during processing of semen freezing in sambar deer

Cryoprotectant*	Sperm survival rate evaluated at			
	dilution with cryoprotectant free diluter	cooling at 5 for 3 hr	equilibrating for 12 hr following addition of cryoprotectant-containing diluter	24 hr after freezing
Glycerol	81.7	75.4	71.8 <sup>a</sup>	67.7 <sup>a</sup>
DMSO			69.6 <sup>b</sup>	64.4 <sup>b</sup>
SEM	3.04	2.42	0.63	1.17

\* The diluter was Tris-yolk extender and the concentration of cryoprotectant was 7 % in this trial.

<sup>a, b</sup> Means with different superscript within column differ significantly (P<0.05).

表 4. 平衡時間對水鹿精液冷凍保存過程中精子存活率之影響

Table 4. Effect of equilibration period on sperm survival rate during processing of semen freezing in sambar deer \*

Equilibration period (hr)	Sperm survival rate evaluated at	
	before freezing	24 hr after freezing
8	70.1 <sup>b</sup>	64.8
10	69.8 <sup>bc</sup>	65.1
12	71.6 <sup>a</sup>	66.4
14	68.8 <sup>d</sup>	64.9
16	69.2 <sup>cd</sup>	65.1
SEM	0.43	0.26

\* Tris-yolk diluter containing 7 % glycerol was used in this trial.

a, b, c, d Means with different superscript within column differ significantly (P<0.05).

表 5. 甘油濃度對水鹿精液冷凍保存過程中精子存活率之影響

Table 5. Effect of glycerol concentration on sperm survival rate during processing of semen freezing in sambar deer \*

Glycerol concentration	Sperm survival rate evaluated at	
	equilibrating for 12 hr	24 hr after freezing
5	72.0 <sup>b</sup>	64.2 <sup>b</sup>
6	72.4 <sup>ab</sup>	67.8 <sup>ab</sup>
7	75.2 <sup>a</sup>	71.7 <sup>a</sup>
8	73.8 <sup>ab</sup>	68.5 <sup>ab</sup>
9	72.1 <sup>ab</sup>	66.3 <sup>b</sup>
SEM	0.55	0.45

\* Tris-yolk diluter was used in this trial.

<sup>a, b</sup> Means with different superscript within column differ significantly ( $P < 0.05$ ).



## 陸、討論

一般鹿隻之血液中睪固酮含量具有一年內之週期變化。本試驗中，牡台灣水鹿血清中睪固酮含量，約在 5 月間開始上升，相較於生活在寒帶之馴鹿 (Whitehead and McEwan, 1973)，與溫帶地區之紅鹿 (Lincoln, 1971; Lincoln and Kay, 1979; Suttie *et al.*, 1984; Lincoln *et al.*, 1970)、白尾鹿 (Brown *et al.*, 1978; McMillin *et al.*, 1974; Mirarchi *et al.*, 1977b; 1978)、黑尾鹿 (West and Nordan, 1976) 與 Wapiti (Haigh *et al.*, 1984) 等鹿種，以及台灣梅花鹿 (陳與楊, 1995; 楊, 1994, 1995a; 楊與馬, 1995)，其血清中睪固酮含量上升之時間較早；但較麋者為晚 (Schams and Barth, 1982; Sempere and Boissin, 1981; 1983)。

牡台灣水鹿血清中睪固酮含量達到巔峰之時間在各個體間變異頗大，約在 7 月至 12 月初之間，但平均在 10 月份達到高峰。此一高峰時間恰在台灣水鹿配種最密集之時間範圍內 (9~11 月) (楊與陳, 1994a)。多種溫帶鹿種，如紅鹿 (Lincoln, 1971; Lincoln and Kay, 1979; Lincoln *et al.*, 1970; Suttie *et al.*, 1984)、白尾鹿 (Brown *et al.*, 1978; McMillin *et al.*, 1974; Mirarchi *et al.*, 1977b; 1978)、黑尾鹿 (West and Nordan, 1976) 與台灣梅花鹿 (陳與楊, 1995; 楊, 1994, 1995a; 楊與馬, 1995)，其睪固酮巔峰時間皆發生於 10 月與 11 月之間。但馴鹿之睪固酮巔峰時間則發生於 9 月與 10 月之間 (Whitehead and McEwan, 1973)；Wapiti 之睪固酮巔峰時間則發生於 8 月與 9 月之間 (Haigh *et al.*, 1984)；麋之睪固酮巔峰時間則發生於 7 月至 8 月之情慾期間 (Schams and Barth, 1982; Sempere and Boissin, 1981; 1983)。飼養於美國之牡坡鹿 (一種亞熱帶鹿種)，其血清中睪固酮含量自 11 月開始上升，於 1 月達到高峰 (Monfort *et al.*, 1993b)，而其情慾季節

在晚冬至早春 (Wemmer and Grodinsky, 1988)。由上述情形可知，鞣固酮含量達到顛峰之時間具有種別間之差異，但各種鹿隻之鞣固酮含量巔峰，率皆發生於其情慾季節開始之前或開始後不久。此外，在所有曾被研究過之各種鹿隻中〔紅鹿 (Lincoln, 1971; Lincoln and Kay, 1979; Lincoln *et al.*, 1970; Suttie *et al.*, 1984) 馴鹿 (Whitehead and McEwan, 1973) 白尾鹿 (Brown *et al.*, 1978; McMillin *et al.*, 1974; Mirarchi *et al.*, 1977b; 1978) 黑尾鹿 (West and Nordan, 1976) Wapiti (Haigh *et al.*, 1984) ? 鹿 (Asher *et al.*, 1987) 麋 (Schams and Barth, 1982; Sempere and Boissin, 1981; 1983) 台灣梅花鹿 (陳與楊, 1995; 楊, 1994, 1995a; 楊與馬, 1995)〕，鞣固酮含量在達到顛峰之後，均迅速下降，從未維持一長久之高原狀態，在本研究中，牡台灣水鹿血清中鞣固酮含量亦在高峰之後即逐漸下降。

牡台灣水鹿血清中鞣固酮含量，約在 2 月至 4 月之間達到極低且穩定之槽底含量 (trough level)。生活於寒帶之馴鹿，因其環境之季節性變化最明顯與嚴苛，故生殖季節極度集中於一、二個月之內，因此血漿中鞣固酮維持於極低且穩定含量之時間長達 9~10 個月 (Whitehead and McEwan, 1973)。本研究中，牡水鹿血清中鞣固酮槽底含量發生於 2~4 月，而紅鹿 (Lincoln, 1971; Lincoln and Kay, 1979; Lincoln *et al.*, 1970; Suttie *et al.*, 1984) 白尾鹿 (Brown *et al.*, 1978; McMillin *et al.*, 1974; Mirarchi *et al.*, 1977b; 1978) 黑尾鹿 (West and Nordan, 1976) 與 Wapiti (Haigh *et al.*, 1984) 等溫帶鹿隻，及台灣梅花鹿 (陳與楊, 1995; 楊, 1994; 1995a; 楊與馬, 1995)，其槽底含量皆發生於 6~7 月，而坡鹿者更遲至 7~10 月 (Monfort *et al.*, 1993b); 麋鹿血清中鞣固酮槽底含量則發生於 9~1 月 (Schams and Barth, 1982; Sempere and Boissin, 1981; 1983)。

本試驗中，台灣水鹿大約一年完成一次鹿角週期，其解角日期集中於 2 月與 3 月，而與先前之報告（楊與陳，1994a）一致，顯示台灣水鹿之解角確實具有季節性。在印度之印度水鹿其解角發生於三月至八月，而集中於四月至六月（Acharjyo, 1983）。在美國之印度水鹿，其解角發生於三月至七月，而集中於四月至六月（Shea *et al.*, 1990）。中國大陸之水鹿整年皆有鹿隻解角，但發生於三月至六月者佔 83.6%（盛，1992）。以上資料顯示水鹿之解角時間具有季節性。然而，亦有報告指出在紐約動物園之印度水鹿與馬來亞水鹿，其解角並無季節性（Crandall, 1964）。由此可知，不同地區之水鹿，其解角時間之分佈不同。另外，楊與陳（1994a）曾指出水鹿解角之時間受年齡影響。

台灣水鹿之解角雖然具有季節性，但期間之分佈較台灣梅花鹿者為長，解角之巔峰時間亦較台灣梅花鹿為早（陳與楊，1995；楊，1993；1994；1995a；楊與馬，1994；楊與陳，1994b）。此顯示相同地區之不同種鹿隻，其解角時間並不相同。

分析台灣水鹿鹿角週期之組成，本試驗中，茸角期長度為  $101 \pm 6$  日，硬角期長度為  $242 \pm 5$  日，與台灣梅花鹿之週期結構（陳與楊，1995；楊，1993；1994；1995a；楊與馬，1994；楊與陳，1994b）相近，亦與日本梅花鹿（Goss, 1969b）？鹿（Schnare and Fisher, 1987）者相當。本試驗中，兩次解角之時距為  $343 \pm 7$  日，與先前之報告（楊與陳，1994a）相近，且與一年無異（ $P > 0.05$ ）。

一般而言，牡鹿之鹿角係在血液中睪固酮含量下降時解角；在睪固酮含量低時生長茸角；在睪固酮含量上升時骨化並蛻落茸毛，而成為骨質硬角。本試驗中，牡台灣水鹿解角發生於血清中睪固酮含量下降至平均為  $5.4 \pm 0.3$  ng/ml 之時；而蛻茸發生於血清中睪固酮含量上升

至平均為  $5.8 \pm 0.6$  ng/ml 之時。此等血清中睪固酮含量之變化與鹿角週期之關係（意即在睪固酮含量下降時解角，在含量低時生長茸角，而在含量上升時蛻茸），相似於所有被測試過之鹿隻（紅鹿 *Lincoln et al.*, 1970）、馴鹿（*Whitehead and McEwan*, 1973）、白尾鹿（*Brown et al.*, 1978; *McMillin et al.*, 1974; *Mirarchi et al.*, 1975; 1977b）、黑尾鹿（*West and Nordan*, 1976）、麇（*Sempere and Boissin*, 1981）與台灣梅花鹿（*陳與楊*, 1995; *楊*, 1994; 1995a; *楊與馬*, 1994; *楊與陳*, 1994b)）。本試驗中，水鹿解角時之血清中睪固酮含量為  $5.4 \pm 0.3$  ng/ml，似高於台灣梅花鹿解角時之  $0.35 \pm 0.08$  ng/ml（*楊與馬*, 1995）、黑尾鹿之  $< 1.0$  ng/ml（*West and Nordan*, 1976）、白尾鹿之 1.54 ng/ml（*Mirarchi et al.*, 1975）或 3.5~4.0（*Brown et al.*, 1978）。本試驗中，水鹿蛻茸時之血清中睪固酮含量為  $5.8 \pm 0.6$  ng/ml，似亦較黑尾鹿之 1.5 ng/ml（*West and Nordan*, 1976）為高，而相近於白尾鹿之 3~4 ng/ml（*Mirarchi et al.*, 1975）或 4.5~6.0 ng/ml（*Brown et al.*, 1978）。

在一般溫帶鹿種中，血液中睪固酮含量與精液性狀、睪丸組織學及重量息息相關。本試驗中，牡台灣水鹿血清中睪固酮約在 2 月至 4 月之間達到極低且穩定之含量，亦在此期間，所有鹿隻皆未被採得精液。在此期間之前後相鄰時間，亦有部分鹿隻未能被採出精液。在所能採得之精液中，其精液品質約自 5 月開始上升，而於 8 月至 9 月間達到顛峰。此品質顛峰時間，恰在水鹿配種集中月份（9~11 月）（*楊與陳*, 1994a）之前或當中。值得一提者，台灣水鹿可能整年皆可生殖（*楊與陳*, 1994a），但在本研究中，2~4 月並不能採出精液。此是否係因在此時間較難採出精液而非無精液可採，抑或不同年齡之牡鹿無生殖能力之時間略有不同，則有待進一步探討。本試驗中，牡台灣水鹿之精液量與精子濃度，較吳等（2002）所述者為高，精子正常型

態比例則相似。在樞軸鹿（一種熱帶鹿種），即使在茸角期，精液之精子濃度與活力等精液品質仍然甚佳（Loudon and Curlewis, 1988）。飼養於美國之坡鹿，在一年四季皆可採得具有活力精子之精液，但於冬季與春季之精液具有最佳之精子活力（Monfort *et al.*, 1993b）。由此可見各種熱帶或亞熱帶鹿種精液性狀之季節性變化情形，並不相同。由鹿角週期與精液性狀觀之，台灣水鹿仍具有季節性，且其時間關係與溫帶鹿種相似，惟稍向前平移一段時間而已。

在本試驗中，以 7% 甘油為抗凍劑時，以 Tris-蛋黃、Tris-檸檬酸-蛋黃與檸檬酸鈉-蛋黃等三種稀釋液製作水鹿之冷凍精液，其解凍後之精子存活率，在三者之間無顯著差異，皆在 65~67% 之間（見表 2），此等精子之存活率已不低於各種稀釋液抗凍劑配方在紅鹿與 wapiti 之使用效果（解凍後之存活率為 30~70%）（reviewed by Asher *et al.*, 2000）。此亦顯示蛋黃之使用，對水鹿並不造成困擾，而不似在山羊者，其精液成分與蛋黃之間發生毒性交互作用，導致精子死亡（Corteel and Paquignon, 1984）。

Dott and Utsi（1973）以含 20% 或 30% 蛋黃之稀釋液製作馴鹿顆粒狀冷凍精液，解凍後，運動精子比例似不減少。然而，在 Dott and Utsi（1973）之試驗中，發現以含肌醇（inositol）之稀釋液稀釋後，精子失去運動力。因此，本研究不宜過度延伸推測為：稀釋液種類皆不影響精子活力。

另外，Haigh *et al.*（1986）評估 20% egg yolk-citrate low-fat milk 與 vegetable protein extender 等三種稀釋液，以 7~10% 之甘油當作抗凍劑，分別添加或不添加 0.2% sodium EDTA，製作 wapiti 冷凍精液之效果，發現以 20% egg yolk-citrate、low-fat milk 當作稀釋液時，可以成功地保存精子之活力與頭巾完整，尤其在 0.2% sodium EDTA

被添加時；而 vegetable protein extender 則不適用於 wapiti 精液之冷凍保存。

Veldhuizen (1994) 評估 sodium citrate-egg-yolk ( Krzywinski and Jaczewski, 1978 )、tris-glucose-citrate-egg yolk ( Evans and Maxwell, 1987 )、skim cow's milk-egg yolk ( Vinha and Coughrough, 1972 )、lactose-egg yolk ( Dott and Utsi, 1973 ) 與合成之綿羊稀釋液 ( RSD-1 ) ( Upreti *et al.*, 1995 ) 等五種稀釋液，與甘油 propan-1,2-diol ( PROH ) 與 dimethyl sulphoxide ( DMSO ) 等三種抗凍劑之組合用於紅鹿與？鹿精液冷凍保存之效果，結果發現：在紅鹿以 tris-glucose-citrate-egg yolk 當作稀釋液時，以甘油當作抗凍劑，可得最佳之解凍後精子活力 (  $56.7 \pm 8.4\%$  )；而以 lactose-egg yolk 當作稀釋液時，以甘油當作抗凍劑，可得較高之解凍後精子頭巾完整性；在？鹿，以 skim cow's milk-egg yolk 當作稀釋液時，以 glycerol 當作抗凍劑，可得最佳之解凍後精子活力 (  $76.7 \pm 8.0\%$  )。然而，體內評估之結果顯示，在紅鹿，sodium citrate-egg-yolk、tris-glucose-citrate-egg yolk 與 lactose-egg yolk 三者無實際差異 ( 40~50% 牝紅鹿懷孕， $P > 0.1$  )；在？鹿，不同稀釋液與抗凍劑組合之間亦無顯著差異 ( 65~71% 牝？鹿懷孕， $P > 0.1$  ) ( Veldhuizen, 1994 )。

Veldhuizen (1994) 在上述五種稀釋液之比較中，發現除了合成之綿羊稀釋液 ( RSD-1 ) 之外，不論何種稀釋液，皆以甘油當作抗凍劑之結果較其他兩種抗凍劑者為佳。此等結果亦與本試驗結果相符。事實上，甘油為用於製作哺乳動物冷凍精液最主要之抗凍劑 ( Watson, 1979 )。

甘油雖然具有保護精子免於冷凍傷害之效，但對精子亦具有直接之毒性 ( Watson, 1979 )，因此，其最適使用濃度應加以測試。Unal *et*

*al.* ( 1978 )指出,含有雙糖之牛隻稀釋液可使用較低濃度之甘油( 3~4 % ), 而不含雙糖之稀釋液需使用至少 7%之甘油。在本試驗, 甘油 5~9% 範圍雖然都可獲得解凍後精子存活率良好之冷凍精液, 但以 7 %之甘油濃度者為最佳( 見表 5)。一般而言, 在鹿科動物以 5~10% 甘油作為抗凍劑, 皆可獲得具有解凍後存活率尚可接受之冷凍精液 ( Asher *et al.*, 2000 )。在馴鹿, 雖然 Dott and Utsi ( 1973 ) 指出含 3.0 %甘油( 含 77% v/v 0.3 M lactose )及含 2.7%甘油( 含 67.3% v/v 0.32 M glucose ) 之冷凍精液解凍後運動精子之比例似乎不下降, 但體內授精試驗卻無成功之例。綜合上述討論, 在一般不含雙糖之稀釋液中, 製作鹿隻冷凍精液時, 甘油濃度不宜太低。以本研究所用 Tris-蛋黃稀釋液而言, 製作水鹿冷凍精液時, 甘油濃度以 7%為最佳。

## 柒、結論

本試驗顯示，牡台灣水鹿血清中雄性素含量、鹿角週期與精液性狀具明顯之季節性變化，且三者之間具有密切之時間關係。在血清中雄性素含量下降時解角；並在含量低時生長茸角且精液不容易採得或品質較差；在血清中雄性素含量上升時完成蛻茸；且在含量高時，精液品質較佳。牡台灣水鹿之精液冷凍保存試驗顯示，以 Tris-蛋黃、Tris-檸檬酸-蛋黃與檸檬酸鈉-蛋黃等三種稀釋液保存水鹿精液，三者之效果並無顯著差異；在以 Tris-蛋黃為稀釋液時，抗凍劑種類以甘油較 DMSO 為佳；添加甘油後之平衡時間以 12 小時為最佳；甘油之最終濃度以 7% 為最佳。



## 捌、參考文獻

- 吳明哲。1992。家畜禽人工生殖技術。台灣省畜產試驗所編印。
- 吳瑞得、董光中、馮翰鵬、郭財榮、蔡沛學與鄭豐邦。2002。畜養牡台灣梅花鹿及牡台灣水鹿之生殖性狀分析：以直腸電刺激採精法進行精液性狀評估。台灣獸醫誌 28: 204-210。
- 盛和林（編）。1992。中國鹿類動物。華東師範大學出版社，上海，中國。
- 陳俊吉、林武霆、劉漢根與楊錫坤。1998。類固醇與度巴胺拮抗劑給予對梅花鹿鹿茸生產之影響。中畜會誌 27: 383-393。
- 陳俊吉與楊錫坤。1995。短光照期與長光照期交替進行對台灣梅花鹿鹿角週期與睪丸功能之影響。中畜會誌 24: 61-80。
- 楊錫坤。1993。兩不同長光照期交替進行對台灣梅花鹿體重變化、鹿角與換毛週期之影響。中畜會誌 22: 387-399。
- 楊錫坤。1994。維持長光照期對梅花鹿睪固酮分泌與代謝之影響。中畜會誌 23: 373-390。
- 楊錫坤。1995a。長光照及褪黑素處理對梅花鹿鹿茸生產與睪丸功能之影響。中畜會誌 24: 163-180。
- 楊錫坤。1995b。鹿茸生產。在：戴謙(主編)，台灣農業要覽：畜牧篇，pp. 203-206。豐年社，台北。
- 楊錫坤與馬春祥。1994。台灣梅花鹿之生殖性狀與鹿角週期。中畜會誌。23: 43-55。
- 楊錫坤與馬春祥。1995。牡台灣梅花鹿血液中睪固酮含量之季節性變化。國立台灣大學農學院研究報告 35: 32-44。
- 楊錫坤與陳俊吉。1994a。舍飼台灣水鹿之生殖及生長性狀與鹿角週期。東海學報 35: 187-200。

楊錫坤與陳俊吉。1994b。補充光照對梅花鹿鹿茸生產與血清中睪固酮含量之影響。中畜會誌 23: 361-371。

Acharjyo, L. N. 1983. Observations on aspects of antler casting in captive sambar deer. pp. 23-28. In: R. D. Brown (ed.), Antler Development in Cervidae. Caesar Kleber Wildlife Research Institute, Kingsville, TX.

Argo, C. M., H. N. Jabbour, P. J. Goddard, R. Webb and A. S. I. Loudon. 1994. Superovulation in red deer (*Cervus elaphus*) and Père David's deer (*Elaphurus davidianus*), and fertilization rates following artificial insemination with Père David's deer semen. J. Reprod. Fert. 100: 629-636.

Arthur, G. H., D. E. Noakes and H. Pearson. 1989. Veterinary Reproduction and Obstetrics, 7th ed., W. B. Saunders, London, U. K.

Asher, G. W., A. M. Day and G. K. Barrell. 1987. Annual cycle of liveweight and reproductive 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. Fert. 79: 353-362.

Asher, G. W. and A. J. Peterson. 1991. Pattern of LH and testosterone secretion of adult male fallow deer (*Dama dama*) during the transition into the breeding season. J. Reprod. Fert. 91: 649-654.

Asher, G. W., A. J. Peterson and J. J. Bass. 1989. Seasonal pattern of LH and testosterone secretion in adult male fallow deer, *Dama dama*. J. Reprod. Fert. 85: 657-665.

Asher, G. W., C. J. Morrow, H. N. Jabbour, R. O. Mulley, F. A. Veldhuizen and M. Langridge. 1992. Laparoscopic intrauterine insemination of fallow deer with frozen-thawed semen after synchronization with CIDR devices. N. Z. Vet. J. 40: 8-14.

Asher, G. W., D. C. Kraemer, S. J. Magyar, M. Brunner, R. Moerbe 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., 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 reproductive parameters of adult male European fallow deer (*Dama dama dama*) and hybrid Mesopotamian×European fallow deer (*D. d. mesopotamica*×*D. d. dama*). *Anim. Reprod. Sci.* 45: 201-215.
- Asher, G. W., J. L. Adam, R. W. James and D. Barnes. 1988a. Artificial insemination of farmed fallow deer (*Dama dama*): fixed-time insemination at a synchronized oestrus. *Anim. Prod.* 47: 487-492.
- Asher, G. W., J. L. Adam, W. Otway, P. Bowmar, G. van Reenan, G. C. Mackintosh and P. Dratch. 1988b. Hybridization of Père David' s deer (*Elaphurus davidianus*) and red deer (*Cervus elaphus*) by artificial insemination. *J. Zool.* 215: 197-203.
- 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.
- Bainbridge, D. R. J., S. L. Catt, G. Evans and H. N. Jabbour. 1999. Successful *in vitro* fertilization of *in vivo* matured oocytes aspirated laparoscopically from red deer hinds (*Cervus elaphus*). *Theriogenology* 51: 891-898.
- Barrell, G. K., P. D. Muir and A. R. Sykes. 1985. Seasonal profiles of plasma testosterone, prolactin and growth hormone in red deer stags. pp. 185-190. In: K. Drew and F. Fennessy (eds.), *Biology of Deer Production*. The Royal Soc. New Zealand, Wellington.
- Bearden, C. J. and J. W. Fuquay. (eds.). 1997. Semen processing, storage and handling. In: *Applied Animal Reproduction*, 4th ed., Prentice Hall, New Jersey, U. S. A., pp. 171-191.
- Bierschwal, C. J., E. C. Mather, C. E. Martin, D. A. Murphy and L. J. Korschgen. 1970. Some characteristics of deer semen collected by electroejaculation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 157: 627-632.
- Blottner, S., O. Hingst and H. H. D. Meyer. 1996. Seasonal spermatogenesis and

- testosterone production in roe deer (*Capreolus capreolus*). J. Reprod. Fert. 108: 299-305.
- Brown, R. D., C. C. Chao and L. W. Faulkner. 1983. The endocrine control of the initiation and growth of antlers in white-tailed deer. Acta Endocr. 103: 138-144.
- Brown, R. D., R. L. Cowan and J. F. Kavanaugh. 1978. Effect of pinealectomy on seasonal androgen titers, antler growth and feed intake in white-tailed deer. J. Anim. Sci. 47: 435-440.
- Bubenik, G. A. 1983. Endocrine regulation of the antler cycle. pp. 73-107. In: R. D. Brown (ed.), Antler Development in Cervidae. Caesar Kleberg Wildl. Res. Inst., Kingsville, TX.
- Bubenik, G. A., G. M. Brown, A. B. Bubenik and D. A. Wilson. 1975. The role of sex hormones in the growth of antler bone tissue. . Endocrine and metabolic effects of antiandrogen therapy. J. Exp. Zool. 194: 349-358.
- Chaplin, R. E. and R. W. G. White. 1972. The influence of age and season on the activity of the testes and epididymides of the fallow deer, *Dama dama*. J. Reprod. Fert. 30: 361-369.
- Chapman, N. G. and D. I. Chapman. 1979. Seasonal changes in the male accessory glands of reproduction in adult fallow deer (*Dama dama*). J. Zool. Lond. 189: 259-273.
- Corteel, J. M. and M. Paquignon. 1984. Proc. 10th Int. Cong. Anim. Reprod. AI, Urbana, 4, 20. Cited by Parkinson, T., 2001. Artificial insemination. pp. 751-778. In: D. E. Noakes, T. J. Parkinson, G. C. W. England and G. H. Arthur (eds.), Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics. W. B. Saunders, London.
- Crandall, L. S. (ed.). 1964. The Management of Wild Mammals in Captivity. Univ. Chicago Press, Chicago.
- Cupps, P. T. 1990. Reproduction in Domestic animals, 4th ed., Academic Press, Inc. U. S. A.

- Dott, H. M. and M. N. P. Utsi. 1971. The collection and examination of semen of the reindeer (*Rangifer tarandus*). J. Zool. Lond. 164: 419-424.
- Dott, H. M. and M. N. P. Utsi. 1973. Artificial insemination of reindeer (*Rangifer tarandus*). J. Zool. Lond. 170: 505-508.
- Edqvist, L. –E. and G. H. Stabenfeldt. 1993. The endogenous control of reproductive processes. pp. 75-127. In: G. J. King (ed.), Reproduction in Domesticated Animals. Elsevier, Amsterdam.
- England, G. C. W. and P. Ponzio. 1996. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. Theriogenology 46: 165-171.
- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goat. Butterworth, Sydney.
- Fennessy, P. F., C. G. Mackintosh and G. H. Shackell. 1990. Artificial insemination of farmed red deer (*Cervus elaphus*). Anim. Prod. 51: 613-621.
- Garner, D. L. and E. S. E. Hafez. 2000. Spermatozoa and Seminal plasma. pp. 96-109. In: E. S. E. Hafez and B. Hafez (eds.), Reproduction in Farm Animals. 7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Gosch, B. and K. Fischer. 1989. Seasonal changes of testis volume and sperm quality in adult fallow deer (*Dama dama*) and their relationship to the antler cycle. J. Reprod. Fert. 85: 7-17.
- Goss, R. J. 1969a. Photoperiodic control of antler cycles in deer. . Phase shift and frequency changes. J. Exp. Zool. 170: 311-324.
- Goss, R. J. 1969b. Photoperiodic control of antler cycles in deer. . Alterations in amplitude. J. Exp. Zool. 171: 223-234.
- Goss, R. J. 1983. Deer Antler-regeneration, Function and Evolution. Academic Press, New York.
- Hafez, E. S. E. 2000. Preservation and cryopreservation of gametes and embryos. pp. 431-442. In: E. S. E. Hafez and B. Hafez (eds.), Reproduction in Farm Animals.

7th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

- Haigh, J. C., A. D. Barth and P. A. Bowman. 1986. An evaluation of extenders for wapiti, *Cervus elaphus*, semen. *J. Zool. Anim. Med.* 17: 129-136.
- Haigh, J. C., A. D. Barth, W. F. Cates and G. J. Glover. 1985. Electroejaculation and semen evaluation of wapiti. pp. 197-203. In: K. Drew and F. Fennessy (eds.), *Biology of Deer Production*. The Royal Soc. New Zealand.
- Haigh, J. C., A. S. Dradjat and A. W. English. 1993. Comparison of two extenders for the cryopreservation of chital (*Axis axis*) semen. *J. Zool. Wildl. Med.* 24: 454-458.
- Haigh, J. C. and G. Bowen. 1991. Artificial insemination of red deer (*Cervus elaphus*) with frozen-thawed wapiti semen. *J. Reprod. Fert.* 93: 119-123.
- Haigh, J. C., W. F. Cates, G. J. Glover and N. C. Rawlings. 1984. Relationships between seasonal changes in serum testosterone concentrations, scrotal circumference and sperm morphology of male wapiti (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fert.* 70: 413-418.
- Hochereau-de Reviers, M. -T. and G. A. Lincoln. 1978. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elaphus*. *J. Reprod. Fert.* 54: 209-213.
- Hunter, R. H. F. (ed.). 1980. In vitro maturation of gametes. pp. 226-264. In: *Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals*. Academic Press, London.
- Jabbour, H. N., F. A. Veldhuizen, G. Green and G. W. Asher. 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.* 98: 495-502.
- Jacobson, H. A., H. J. Bearden and D. B. Whitehouse. 1989. Artificial insemination trials with white-tailed deer. *J. Wildl. Manage.* 53: 224-227.

- Jaczewski, Z and T. Jasiorski. 1974. Observations on the electroejaculation in red deer. *Acta Theriol.* 19: 151-157.
- Krzywinski, A. 1981. Freezing of post-mortem collection semen from moose and red deer. *Acta Theriol.* 26: 424-426.
- Krzywinski, A. 1987. Artificial insemination and embryo transfer in deer: Applying these methods for propagating endangered species. pp. 443-449. In: C. M. Wemmer (ed.), *Biology and Management of the Cervidae*, Smithsonian Institution Press, Washington, D. C.
- Krzywinski, A. and Z. Jaczewski. 1978. Observations on the artificial breeding of red deer. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 43: 271-287.
- Lambiase, I. T., R. P. Amann and J. S. Lindzey. 1972. Aspects of reproductive physiology of male white-tailed deer. *J. Wildl. Manage.* 36: 868-875.
- Lincoln, G. A. 1971. The seasonal reproductive changes in the red deer stag (*Cervus elaphus*). *J. Zool.* 163: 105-123.
- Lincoln, G. A. and R. N. B. Kay. 1979. Effects of season on the secretion of LH and testosterone in intact and castrated red deer stags (*Cervus elaphus*). *J. Reprod. Fert.* 55: 75-80.
- Lincoln, G. A., R. W. Youngson and R. V. Short. 1970. The social and sexual behaviour of the red deer stag. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 11: 71-103.
- Loudon, A. S. I. and J. D. Curlewis. 1988. Cycles of antler and testicular growth in an aseasonal tropical deer (*Axis axis*). *J. Reprod. Fert.* 83: 729-738.
- McMillin, J. M., U. S. Seal, K. D. Keenlyne, A. W. Erickson and J. E. Jones. 1974. Annual testosterone rhythm in the adult white-tailed deer (*Odocoileus virginianus borealis*). *Endocrinology* 94: 1034-1040.
- Magyar, S. J., T. Biediger, C. Hodges, D. C. Kraemer and S. W. J. Seager. 1989. A method of artificial insemination in captive white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Theriogenology* 31: 1075-1080.

- Markwald, R., R. Davis and R. A. Kainer. 1971. Histological and histochemical periodicity of cervine Leydig cells in relation to antler growth. *Gen. Comp. Endocr.* 16: 268-280.
- Mirarchi, R. E., B. E. Howland, P. F. Scanlon, R. L. Kirkpatrick and L. M. Sanford. 1978. Seasonal variation in plasma LH, FSH, prolactin and testosterone concentrations in adult male white-tailed deer. *Can. J. Zool.* 56: 121-127.
- Mirarchi, R. E., P. F. Scanlon and R. L. Kirkpatrick. 1977a. Annual changes in spermatozoa production and associated organs of white-tailed deer. *J. Wildl. Manage.* 41: 92-99.
- Mirarchi, R. E., P. F. Scanlon, R. L. Kirkpatrick and C. B. Schreck. 1977b. Androgen levels and antler development in captive and wild white-tailed deer. *J. Wildl. Manage.* 41: 178-183.
- Mirarchi, R. E., P. F. Scanlon, R. L. Kirkpatrick and C. B. Schreck. 1975. Variation in androgen levels in white-tailed deer in relation to the antler cycle and the breeding season. *J. Anim. Sci.* 40: 185-186.
- Monfort, S. L., G. W. Asher, D. E. Wildt, T. C. Wood, M. C. Schiewe, L. R. Williamson, M. Bush and W. F. Rall. 1993a. Successful intrauterine insemination of Eld's deer (*Cervus eldi thamin*) with frozen-thawed spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 99: 459-465.
- Monfort, S. L., J. L. Brown, M. Bush, T. C. Wood, C. Wemmer, A. Vargas, L. R. Williamson, R. J. Montali and D. E. Wildt. 1993b. Circannual inter-relationships among reproductive hormones, gross morphometry, behaviour, ejaculate characteristics and testicular histology in Eld's deer stags (*Cervus eldi thamin*). *J. Reprod. Fert.* 98: 471-480.
- Monfort, S. L., J. L. Brown, T. C. Wood, C. Wemmer, A. Vargas, L. R. Williamson, R. and D. E. Wildt. 1993c. Seasonal patterns of basal and GnRH-induced LH, FSH and testosterone secretion in Eld's deer stags (*Cervus eldi thamin*). *J. Reprod. Fert.* 98: 481-488.
- Morris, J. M. and G. A. Bubenik. 1983. The effects of androgens on the development of antler bone. pp. 123-141. In: R. D. Brown (ed.), *Antler Development in*



Cervidae. Caesar Kleber Wildlife Research Institute, Kingsville, TX.

Muir, P. D., A. R. Sykes and G. K. Barrell. 1985. Mineralisation during antler growth in red deer. pp. 251-254. In: P.F. Fennessy and K. R. Drew (eds.), *Biology of Deer Production*, The Royal Society of New Zealand, Bulletin 22, Wellington.

Mulley, R. C., N. W. Moore and A. W. English. 1988. Successful uterine insemination of fallow deer with fresh and frozen semen. *Theriogenology* 29: 1149-1153.

Parkinson, T. 2001. Artificial insemination. pp. 751-778. In: D. E. Noakes, T. J. Parkinson, G. C. W. England and G. H. Arthur (eds.), *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. W. B. Saunders, London.

Platz, C. C., S. Magyar, N. Crider, M. Densmore, G. Wiley, M. J. Bowen, J. W. Templeton and D. C. Kraemer. 1982. Cryopreservation of electroejaculated and epididymal spermatozoa in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Annu. Proc. Am. Assoc. Zoo Vet.* 127-129.

Robinson, R. M., J. W. Thomas and R. G. Marburger. 1965. The reproduction cycle of male white-tailed deer in central Texas. *J. Wildl. Manage.* 29: 53-59.

Salisbury, G. W., N. L. VanDemark and J. R. Lodge. 1978. *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*, 2nd ed., Freeman, San Francisco.

SAS, 2002. *SAS User's Guide: Statistics*. SAS Inst. Inc., Cary NC.

Schams, D. and D. Barth. 1982. Annual profiles of reproductive hormones in peripheral plasma of the male roe deer (*Capreolus capreolus*). *J. Reprod. Fert.* 66: 463-468.

Schnare, H. and K. Fischer. 1987. Secondary sex characteristics and connected physiological values in male fallow deer (*Dama dama L.*) and their relationship to changes of the annual photoperiod: doubling the frequency. *J. Exp. Zool.* 244:463-471.

Sempere, A. J. and J. Boissin. 1981. Relationship between antler development and plasma androgen concentrations in adult roe deer (*Capreolus capreolus*). *J.*

Reprod. Fert. 62: 49-53.

Sempere, A. J. and J. Boissin. 1983. Neuroendocrine and endocrine control of the antler cycle in roe deer. pp. 109-122. In: R. D. Brown (ed.), Antler Development in Cervidae. Caesar Kleber Wildlife Research Institute, Kingsville, TX.

Shea, S. M., L.B. Flynn, R. L. Marchinton and J. C. Lewis. 1990. Ecology of sambar deer on St. Vincent National Wildlife Refuge, Florida. Part . Social behavior, movement ecology and food habits. Tall Timbers Research Station, Tallahassee, Florida.

Short R. V. and K. P. McNatty. 1985. Reproduction: workshop report. pp. 479-480. In: P. F. Fennessy and K. R. Drew (eds.), Biology of Deer Production. Royal Soc. New Zealand, Bull. 22.

Snyder, D. L., R. L. Cowan, D. R. Hagen and B. D. Schanbacher. 1983. Effect of pinealectomy on seasonal changes in antler growth and concentration of testosterone and prolactin in white-tailed deer. Biol. Reprod. 29: 63-71.

Stockner, P. K. and C. Bardwick. 1996. The relationship of parameters to fertility in the dog. Canine Practice 16: 15-23.

Strzezek, J., A. Krzywinski and K. Swidowicz. 1985. Seasonal changes in the chemical composition of red deer (*Cervus elaphus*) semen. Anim. Reprod. Sci. 9: 195-204.

Suttie, J. M., G. A. Lincoln and R. N. B. Kay. 1984. Endocrine control of antler growth in red deer stags. J. Reprod. Fert. 71: 7-15.

Suttie, J. M. and R. N. B. Kay. 1985. Influence of plane of winter nutrition on plasma concentration of prolactin and testosterone and their association with voluntary food intake in red deer stags (*Cervus elaphus*). Anim. Reprod. Sci. 8: 247-258.

Suttie, J. M., P. F. Fennessy, K. R. Lapwood and I. D. Corson. 1995. Role of steroids in antler growth of red deer stags. J. Exp. Zool. 271: 120-130.

Unal, M. B., W. E. Berndtson and B. W. Pickett. 1978. Influence of sugars with glycerol on post-thaw motility of bovine spermatozoa in straws. J. Dairy Sci. 61:

83-89.

- Upreti, G. C., J. E. Oliver, D. M. Duganzich, R. Munday and J. F. Smith. 1995. Development of a chemically defined ram semen diluent (RSD-1). *Anim. Reprod. Sci.* 37: 143-157.
- Veldhuizen, F. A. 1994. Studies on cryopreservation of semen of farmed red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*). MSc Thesis, Lincoln University, New Zealand. Cited by Asher, G. W., D. K. Berg and G. Evans. 2000. Storage of semen and artificial insemination in deer. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 195-211.
- Vinha, N. A. and R. I. Coughrough. 1972. Deep freezing of ram semen. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 43: 43-45.
- Watson, P. F. 1979. The preservation of semen in mammals. pp. 283-350. In: C. A. Finn (ed.), *Oxford Review of Reproductive Biology*, Vol. 1, Clarendon Press, Oxford.
- Wemmer, C. and C. Grodinsky. 1988. Reproduction in captive female brow-antlered deer (*Cervus eldi thamin*). *J. Mammal.* 75: 389-393.
- West, N. O. and H. C. Nordan. 1976. Hormonal regulation of reproduction and the antler cycle in the male Columbian black-tailed deer (*Odocoileus hemionus columbianus*). Part . Seasonal changes in the histology of the reproductive organs, serum testosterone, sperm production, and the antler cycle. *Can. J. Zool.* 54: 1617-1636.
- Whitehead, P. E. and E. H. McEwan. 1973. Seasonal variation in the plasma testosterone concentration of reindeer and caribou. *Can. J. Zool.* 51: 651-658.
- Willard, S. T., D. M. Hughes Jr., M. Bringans, R. G. Sasser, D. R. White, J. T. Jaques, R. W. Godfrey, T. H. Welsh Jr. and R. D. Randel. 1996. Artificial insemination, hybridization and pregnancy detection in sika deer (*Cervus nippon*). *Theriogenology* 46: 779-789.
- Wislocki, G. B., J. C. Aub and C. M. Waldo. 1947. The effects of gonadectomy and the administration of testosterone propionate on the growth of antlers in male and

female deer. *Endocrinology* 40: 202-224.

## 玖、英文摘要

# Annual Changes in Reproductive Functions and Cryopreservation of Semen in Formosan Sambar Stags

### Abstract

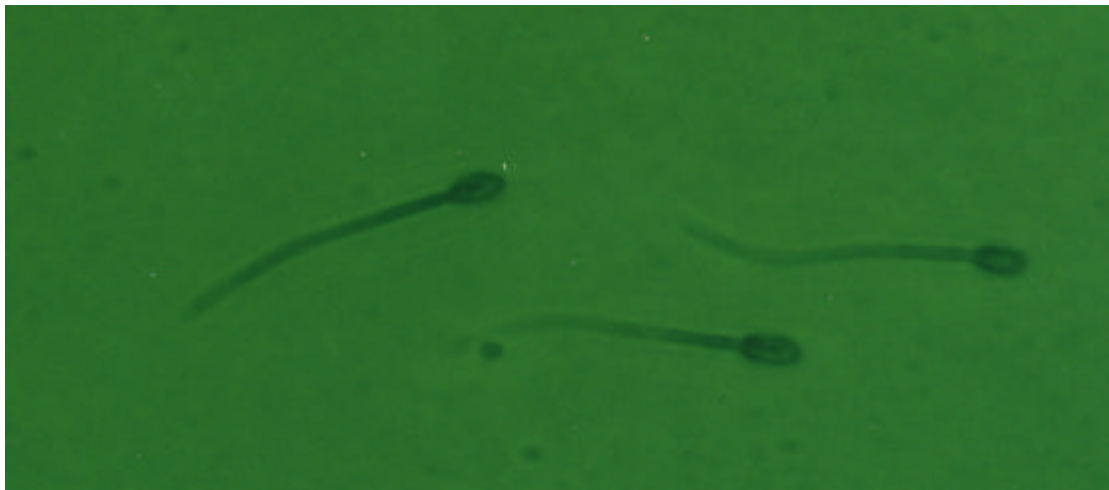
This experiment was conducted to understand the seasonal changes in serum testosterone levels, antler cycles and semen quality and to develop a suitable method for semen cryopreservation in Formosan sambar stags. Five healthy and sex matured Formosan sambar stags exposed to natural photoperiod were restrained physically biweekly. Their blood samples were collected from jugular vein and semen samples were collected by electroejaculation biweekly. Serum testosterone levels were measured by radioimmunoassay and semen qualities were evaluated and recorded. Semen samples with high quality were prepared to frozen semen, and the damage degrees of sperm were evaluated at each stage. The dates of cast and velvet shedding of antlers were recorded. Results showed that serum testosterone levels and semen quality in Formosan sambar stags peaked in August to September and declined to the nadir in February to April. Formosan sambar stags cast in February to March and cleaned velvet in May to June, with  $101 \pm 6$  days (mean  $\pm$  SEM) of velvet phase and  $242 \pm 5$  days of bony phase. Sperm survival rates of post-thaw semen were not different among Tris-egg yolk, Tris-citric acid-egg yolk and sodium citrate-egg yolk extenders. Glycerol was a better cryoprotectant than dimethyl sulfoxide (DMSO). The optimal equilibration period was 12 hr and the optimal concentration of glycerol was 7%. It is concluded that the seasonal change in serum testosterone levels is paralleled with the fluctuation of semen quality in Formosan sambar stags. Formosan sambar stags cast their antlers when serum testosterone level is declining, and clean their antlers when serum testosterone level is rising. Seven percent of glycerol as cryoprotectant and 12 hr equilibration period are optimal variables for semen cryopreservation in sambar stags.

## 拾、附錄

a

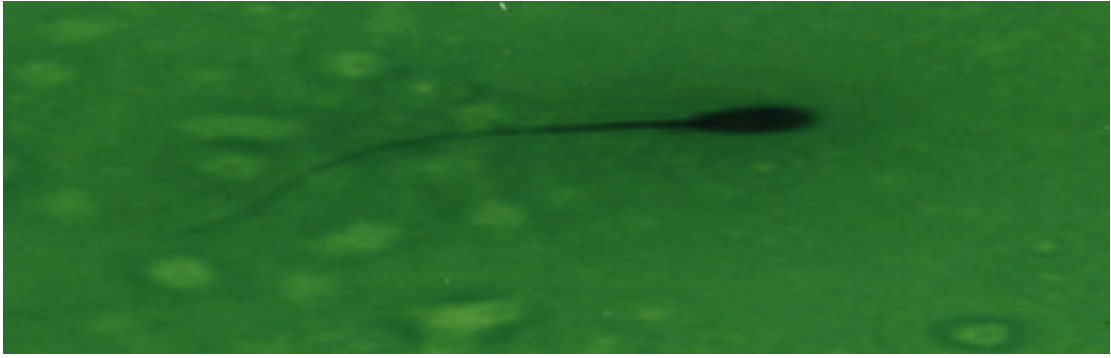


b.



附錄 1. 死活精子。a. 存活精子；b. 死亡精子。(400X)

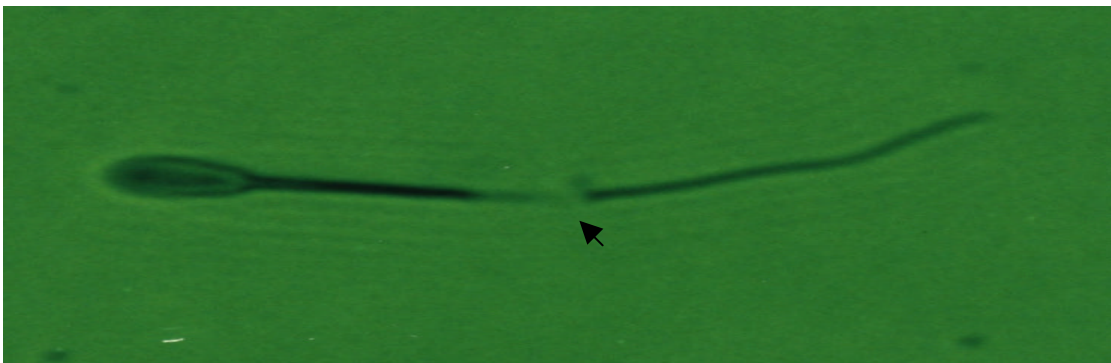
a.



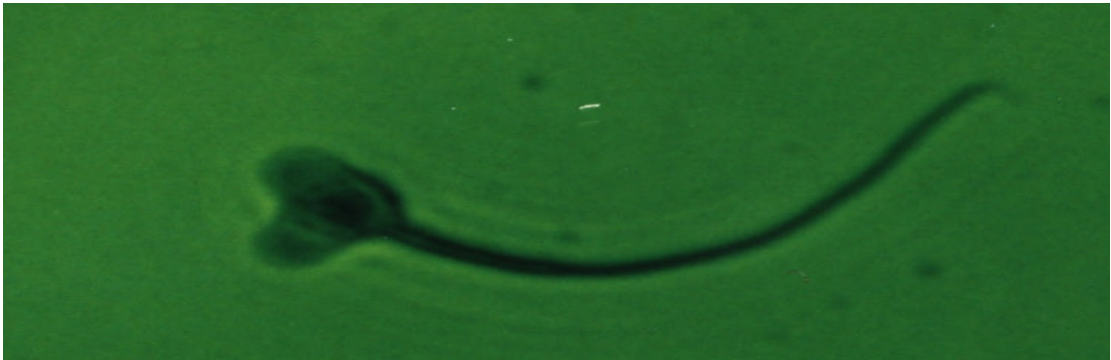
b.



c.



d.



附錄 2. 正常與異常精子。a. 正常精子；b. 尾巴彎曲；c. 尾巴斷裂；d. 頭部異常。(400X)

## 拾壹、小傳

作者王俊強，臺灣省高雄縣人，生於民國 65 年 10 月 13 日，先後畢業於高雄市立中正國民小學、高雄市立大仁國民中學、高雄市立前鎮高級中學。民國 84 年進入東海大學畜產學系就讀，民國 88 年獲得農學士學位，同年考取東海大學畜產學研究所，師從楊錫坤博士研習生殖生理學，並在恩師楊錫坤博士悉心指導下完成本論文。