

行政院農業委員會畜產試驗所
高雄種畜繁殖場

人工生殖科技於鹿隻之應用

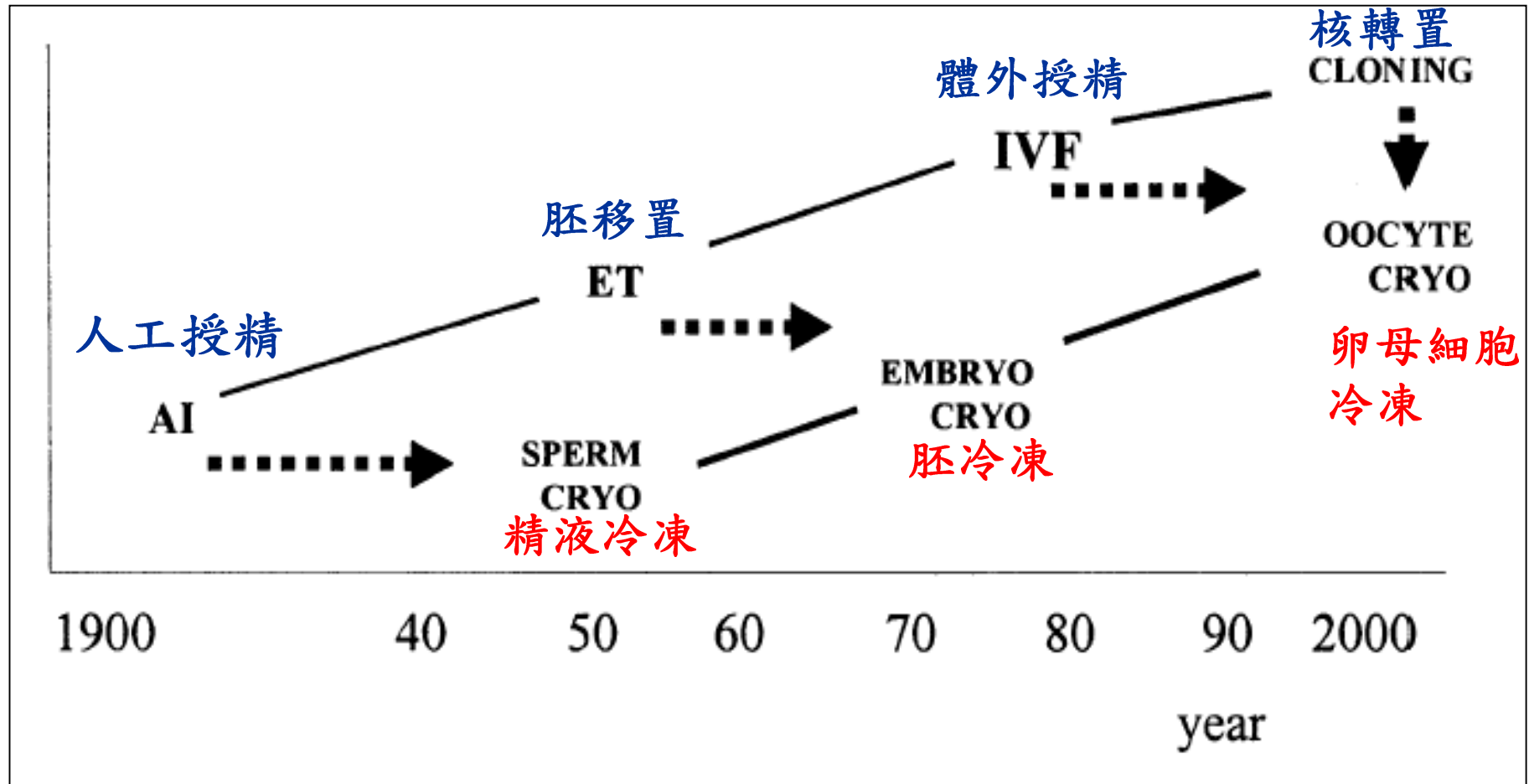
林信宏



LRI

LRI

家畜人工生殖科技應用上的發展



(Arav *et al.*, 2002)

各階段發展內容

- 第一階段
 - 精液收集與冷凍
 - 發情同期化
 - 人工授精
- 第二階段
 - 超量排卵
 - 胚沖洗回收, 冷凍與移置
- 第三階段
 - 選性精液與胚性別鑑定
 - 體外胚生產
 - 胚卵基因分析
 - 複製與基因轉植



韓國

開發出無人-自動擠奶管理系統

開發出共卵畜產、冷凍精子及受精卵的疾病檢查技術

開發出以畜產動物直接生產高價治療劑的技術

開發出主要脂肪儲存及抑制技術

開發出家畜的性別控制技術

實現韓國土種家畜系統的確立及遺傳學式改良技術

開發出家畜的早期死胎及流產防止技術

開發出利用根圈微生物(根部周圍的微生物)的生物粗飼料生產技術

英國

控制基因表現生產水耕肉，使傳統畜牧業轉為工業化生產肉品

以動物福祉為考量，尋求最佳居住、運送與維護健康之方法

針對健康需求從作物或家畜身上提煉維生素、蛋白質、纖維及脂肪酸等營養成分

以商業方法改良動物飼料以增加動物健康

實務利用DNA分析與遺傳選擇法預先得知家畜的性別

實務利用從優秀的家畜個體中篩選出的胚胎作後續利用的技術

德國

實際應用經由卵核移植，使良好、高功能效率的孿生牛

為了達到養殖的目的（抵抗病害和培養生殖能力）動物早期受孕的胚胎，以及小動物的胚胎，基因移植將有實際的應用

用內部物質改善的移植基因植物，將在飼料或食物的生產上廣泛的使用

日本

普及化應用家畜之基因改良技術，使所需性狀（如耐病性、多產性）引入受精卵或胚胎

普及化應用細胞核移植技術複製優良牛

實際應用轉殖技術於胚胎幹細胞，使家畜乳汁中可以分泌生理活性物質（例如抗菌蛋白及血液凝固因子等藥物）

藉著家畜腦神經、內分泌及免疫系統機制的解明，使飼料提供疾病預防及改善之技術普及化

利用孤雌生殖使飼料作物及牧草的雜種優勢品系普及化

利用基因操作修飾瘤胃（第一個胃）微生物之機能性，以提高牧草利用率之技術開發

實際利用基因與蛋白質工程的分子設計技術開發家畜的抗病合成疫苗

根據區別家畜XY精蟲方法的建立，使性別選擇技術普及化

先進電腦與機械裝置於省工放牧技術的普及化

自動化餵食、擠奶及動物糞尿處理技術普及化

利用對於抗原的分析及修飾作用使無過敏畜產品製造技術普及化

在沒有過度控制餵食、運動及睡眠，且不至於生產量下降，符合動物福祉的家畜飼養及管理技術之普及化

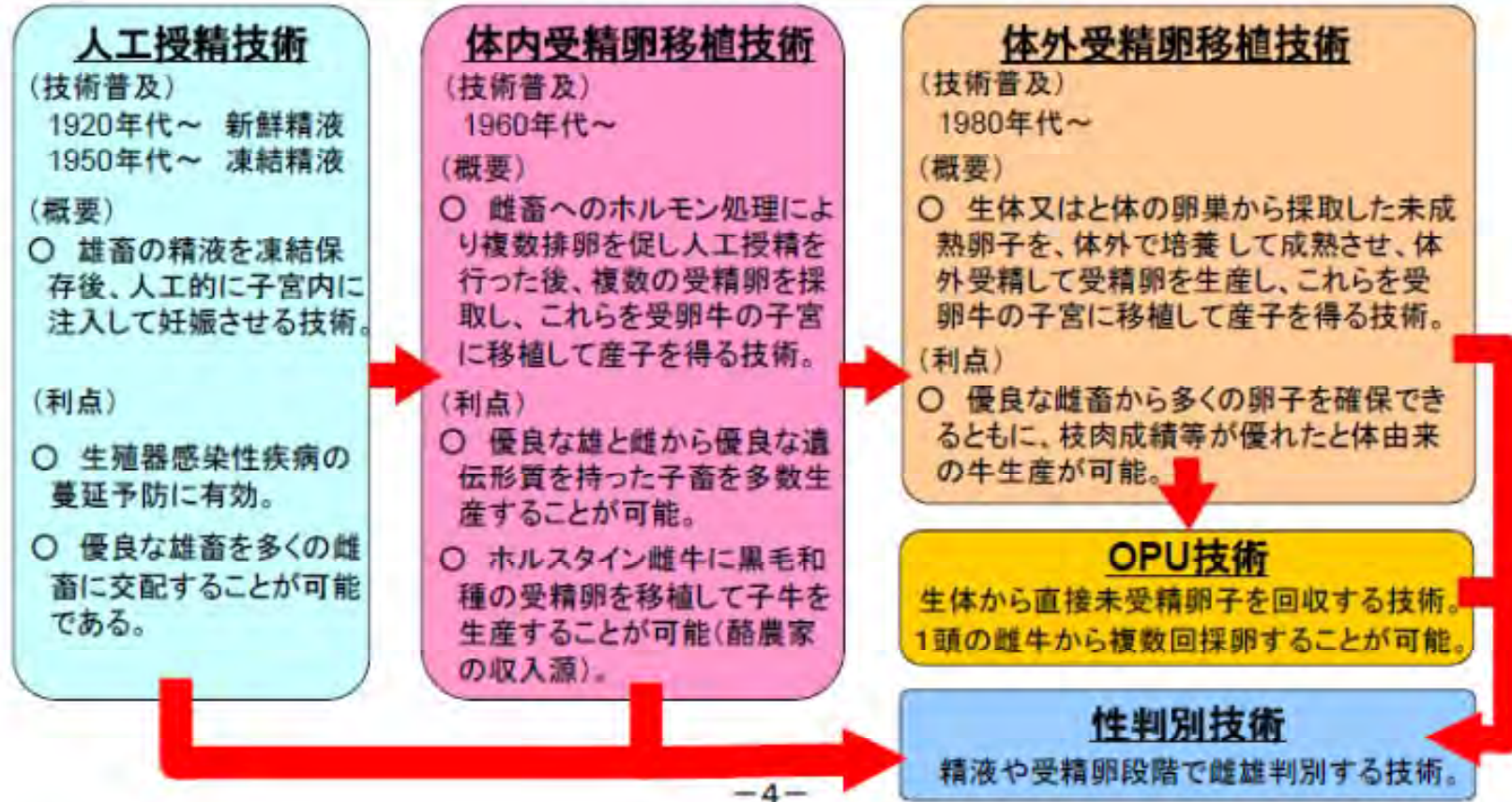
利用形質轉換家畜使乳汁中有效率分泌抗菌蛋白及血液凝固因子等生理活性物質（藥品）的技術

基於對家畜腦下垂體前葉細胞的內分泌機制及免疫系統的解明，有助於預防疾病・恢復正常以及食量增加・乳量控制的技術

基於對腦內訊息傳達的感測使得人類和家畜可以溝通的技術

家畜繁殖技術の発展

- 家畜の繁殖に関する技術は、人工授精技術を基礎に発展し、体内受精卵移植技術、体外受精卵移植技術についても、国内で広く利用されている。
- 現在では、性判別技術やOPU技術(生体卵胞卵子吸引技術)などが実用化され、さらなる普及が期待されている。

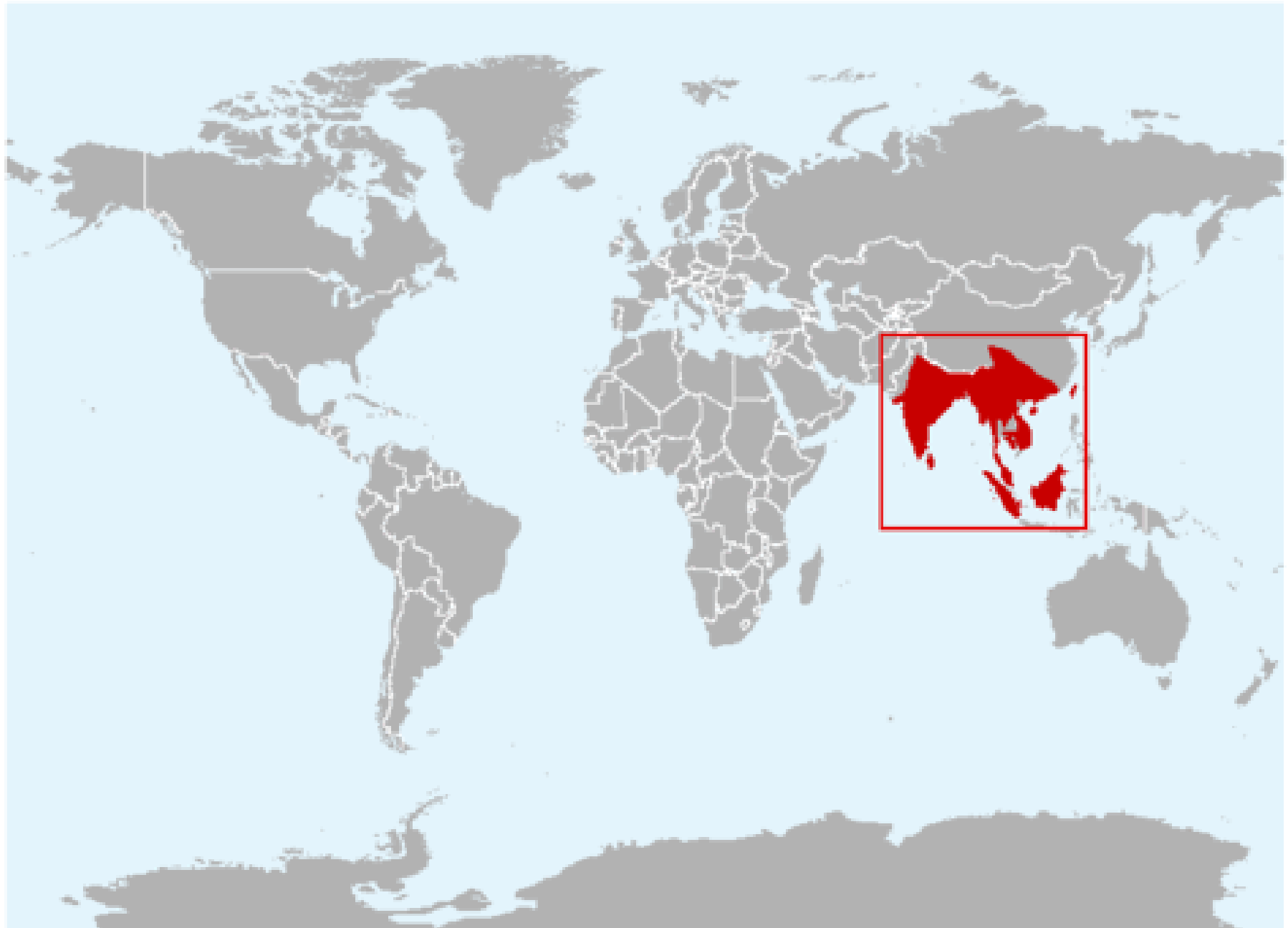


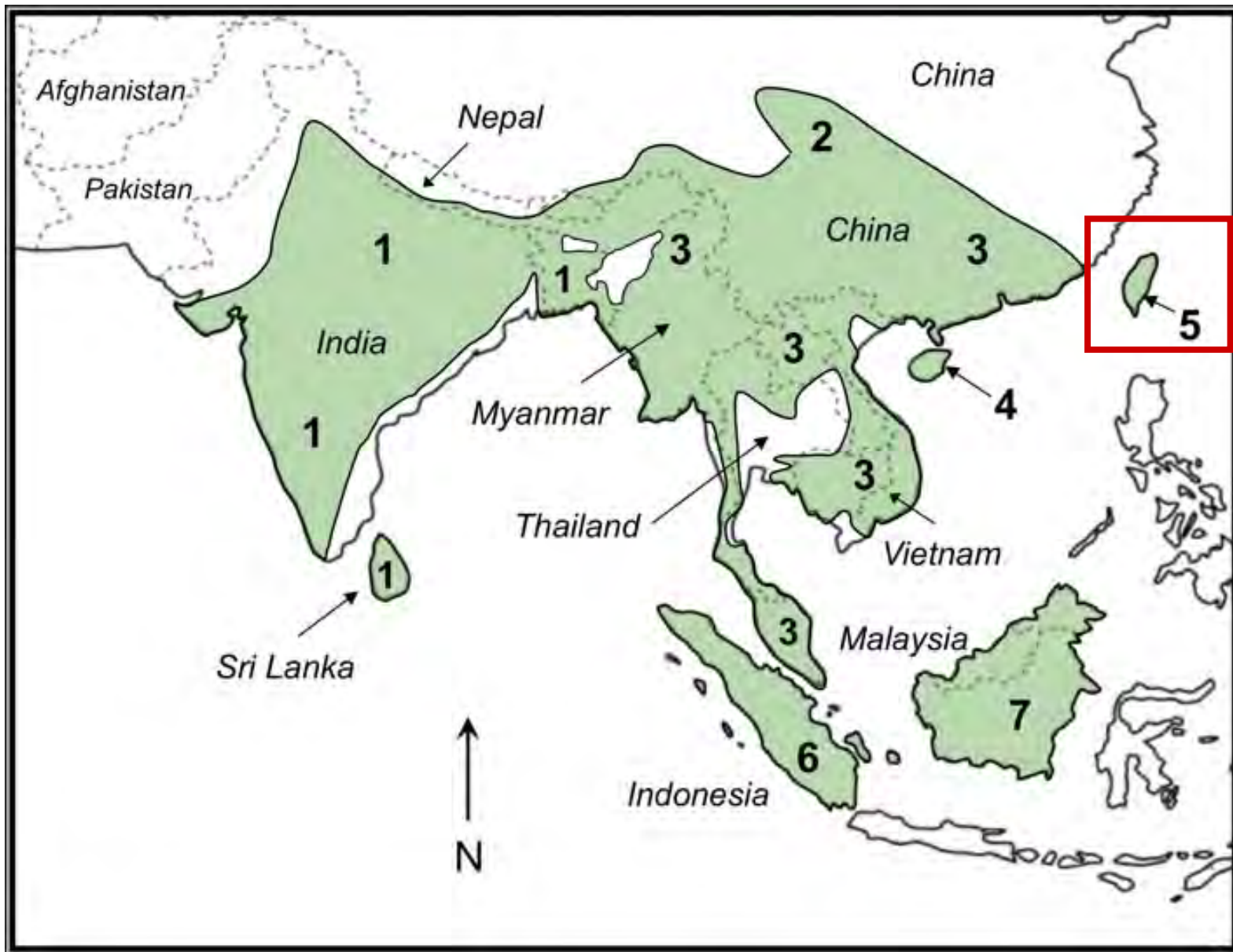
-4-

台灣水鹿人工生殖技術模式建立重要性

- 全世界鹿隻品種超過200種
- 不同品種間之生殖生理具高度差異性
- 季節性繁殖
- 低產 (單胎, 1 calf/year)
- 國內鹿隻主要飼養品種
- 迫切需要人工生殖技術協助
- 具研究挑戰性







(David and Leslie, 2011)

人工生殖於鹿隻之應用效率

AI : 200 straw – 60%效率-120頭仔鹿

MOET: 200 straw – 600頭仔鹿(每頭母鹿可產生
3頭仔鹿)

IVF and OPU : 200 straw–0.5支STRAW 可用於20頭
Donor來源卵之IVF –1200頭仔鹿(每
支straw可產生6頭仔鹿)

(Berg and Asher, 2003)

創新程度

技術整合：針對特有種台灣水鹿開發技術並創新整合種鹿各項人工生殖關鍵技術。

(一) 種公鹿：

公鹿**麻醉保定技術**、**電激採精技術**、**精液冷藏技術**、**精液冷凍稀釋液配製技術**及**精液冷凍保存技術**等**5項**。

(二) 種母鹿：

母鹿**麻醉保定技術**、**直腸觸診技術**、**同期化發情處理技術**、**人工授精技術**、**超量排卵技術**、**水鹿胚沖洗回收技術**、**胚冷凍技術**及**胚移置技術**等**8項**。



麻醉保定技術



種公鹿電激採精技術



種母鹿人工授精技術

重大突破：

- 成功開發**全球第一頭台灣水鹿**利用**新鮮精液人工授精**方式孕育的小水鹿，迄100年已誕生21頭。
- 成功開發**全球第一頭台灣水鹿**利用**冷凍精液人工授精**後誕生之小水鹿，迄100年已誕生71頭。
- 全球第一頭台灣水鹿『小璐』**係利用**玻璃化法冷凍胚移置技術**誕生之小水鹿，應用此創新技術已誕生6頭台灣水鹿。

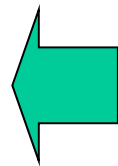
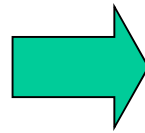


第一階段：93-98年

- 1、同期化發情方法。
- 2、麻醉保定暨公鹿電激採精技術。
- 3、精液冷凍保存技術。
- 4、母鹿生殖檢查及人工授精技術。



台灣水鹿保定流程



電激採精法

透過電刺激器可刺激各種動物射精，電刺激採精器由電流控制器及電擊探棒兩部分組成。



電流控制器

電擊探棒

台灣公水鹿電激採精流程

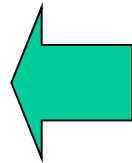
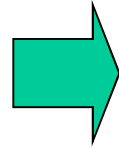


表 1. 公台灣水鹿平均精液性狀

精液量 (ml)	1.2
活力 (0-5)	4.7
精液濃度(億/ml)	8.9
存活率(%)	87.0
畸形率(%)	11.2
pH值	7.1

表 2. 繁殖障礙之台灣公水鹿電激採精後進行精子性狀評估

年齡 (歲)	3
精液量 (ml)	1.2
活力 (0-5)	2 (4.7)
存活率 (%)	68 (87.0)
畸形率 (%)	46 (11.2)

註: ()內為繁殖季節之正常公鹿精液性狀平均值



表. 不同稀釋液種類對台灣水鹿精液冷藏 (4°C) 保存過程中精子活力、存活率和頭帽完整性之影響

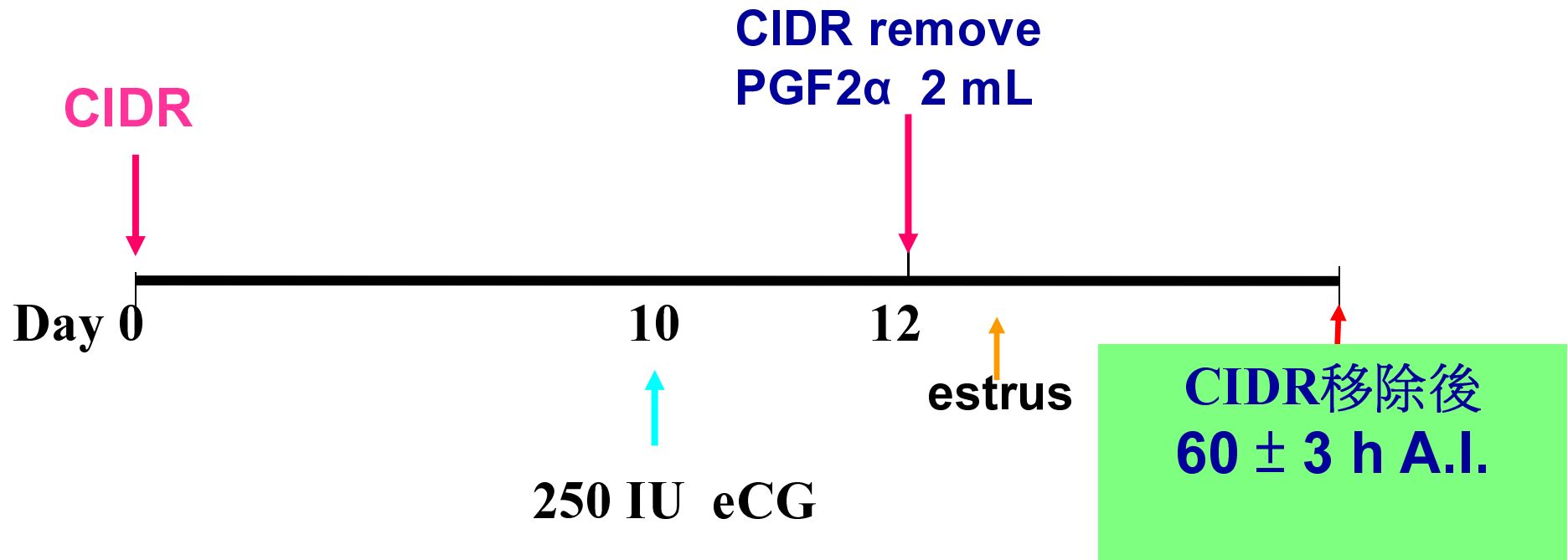
Items	0hr			12hr		
	TCY (1)	TY (2)	CY (3)	TCY	TY	CY
SMS ⁽⁴⁾ (0-5)	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	5±0 ^a	4±0 ^b
VIAB ⁽⁵⁾ (%)	89.3±0.7 ^b	92.1±0.9 ^a	88.3±0.8 ^c	86.8±0.5 ^d	88.1±0.8 ^c	84.2±1.0 ^e
NAR ⁽⁶⁾ (%)	86.5±0.7 ^b	88.5±0.3 ^a	85.4±1.0 ^c	82.3±0.6 ^d	82.5±0.6 ^d	77.3±0.7 ^e

(1) Tris-citric-base medium; (2) TES-base medium; (3) Sodium citrate-base medium; (4) Sperm motility score;

(5) Sperm viability; (6) Acrosome integrity.

a, b, c, d, e Values without same superscripts in the same row are significantly different (P < 0.05).

母水鹿同期化發情調控流程



母台灣水鹿發情同期化處理模式，利用CIDR埋植，並於埋植後之第10日搭配250 IU eCG之注射，第12日CIDR移除同時肌肉注射2ml前列腺素，可獲致極高之母水鹿發情率85.4% (35/41)。

母水鹿保定與人工授精



表. 不同稀釋液種類對台灣水鹿冷藏精液人工授精後懷孕率之影響

Treatment	No. of service	No. (%) of pregnancy ^a	No. (%) of parturient does ^a
TCY ⁽¹⁾	10	7 (70)	7 (70)
TY ⁽²⁾	10	8 (80)	8 (80)
CY ⁽³⁾	10	6 (60)	6 (60)

⁽¹⁾ Tris-citric-base medium; ⁽²⁾ TES-base medium; ⁽³⁾ Sodium citrate-base medium.

^a No significant differences were detected among treatment groups ($P > 0.05$).



圖. 藉由台灣水鹿新鮮精液人工授精技術生下的仔鹿群(畜產試驗所高雄場)



圖. 藉由台灣水鹿新鮮精液人工授精技術生下的仔鹿群(台鹿農場行)

表. 不同稀釋液種類對台灣水鹿**冷凍精液**人工授精後懷孕率之影響(畜產試驗所高雄場)

稀釋液 Diluents	授精頭數 No. of service	懷孕頭數 No. of pregnancy	懷孕率 Pregnant rate (%)
TCY G6 (Tris-Citric-Yolk)	11	3	27.3
TY G6 (TES-Yolk)	15	10	66.7
CY G6 (Citrate-Yolk)	10	1	10.0



圖 . 藉由台灣水鹿冷凍精液人工授精技術生下的仔鹿群(畜產試驗所高雄場)

表. 不同稀釋液種類對台灣水鹿**冷凍精液**人工授精後懷孕率之影響**(台鹿農場行)**

稀釋液 Diluents	授精頭數 No. of service	懷孕頭數 No. of pregnancy	懷孕率 Pregnant rate (%)
TCYG6 (Tris-Citric-Yolk)	8	3	38
TY G6 (TES-Yolk)	22	17	77
CY G6 (Citrate-Yolk)	5	0	0



圖. 藉由台灣水鹿冷凍精液經人工授精產下的雙胞胎仔鹿
(台鹿農產行)



圖 .技轉戶藉由人工授精技術生下之麋紅鹿仔鹿
(苗栗養鹿發展促進協會)

分娩頭數: 14頭

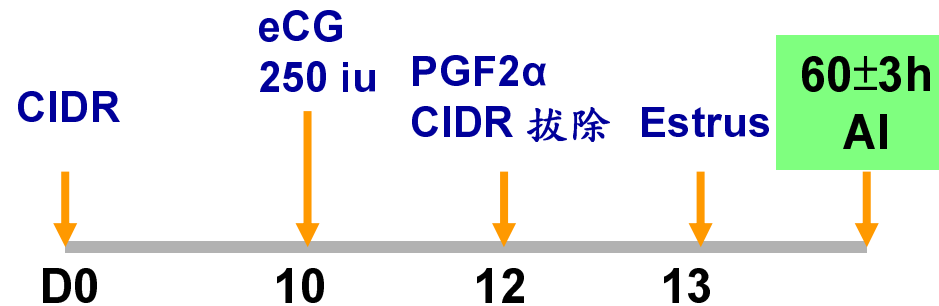
出生仔鹿性別: 13公1母

表. 繁殖與非繁殖季節發情同期化處理對台灣水鹿發情率與人工授精之影響

	處理頭數	發情率 (%)	通過子宮頸口 AI 成功率 (%)
非繁殖季節 ⁽¹⁾	14	6 (42.9) ^a	4 (28.6) ^a
繁殖季節 ⁽²⁾	22	21 (95.4) ^b	19 (86.4) ^b

(1) 三至五月; (2) 七至十月.

^{a, b} Values without same superscripts in the same column are significantly different (P < 0.05).







同期化發情調控技術效益

- 母鹿的分娩日期可預期，提高了仔鹿出生的存活率(由75%上升至95%)。
- 仔鹿出生的時間點接近，母鹿共同哺育，亦提高了仔鹿的育成率(由60%上升至85%)。

母鹿生殖檢查技術效益

- 飼養效率增加10% (淘汰有繁殖障礙的母鹿
----->降低飼養成本)
- 淘汰不具經濟效益的鹿，增加額外的收入
(鹿肉乾等其他產品)。



2009 Semen Catalogue

Leonardo DG Superb Son Motsumi / Adonis Cross

(種鹿精液資訊)



- Fantastic looking trophy head
- Main beam 38.1 / 38.4 inches
- Strong bottom gear & good scoring top tines
- One of his trez was 24 inches long
- Very attractive sought after Trophy Style head with impressive outriggers off royals each side
- His sons have superb long open tines with variations of attractive styles
- Full brother scored 430 @ 3yrs

From: http://www.deergeneticsnz.co.nz/site/deer/files/images/Catalogues/2009/semen_catalogue/Page%201%20Sire%20References.pdf

ADONIS DG- The Super Star (POA)

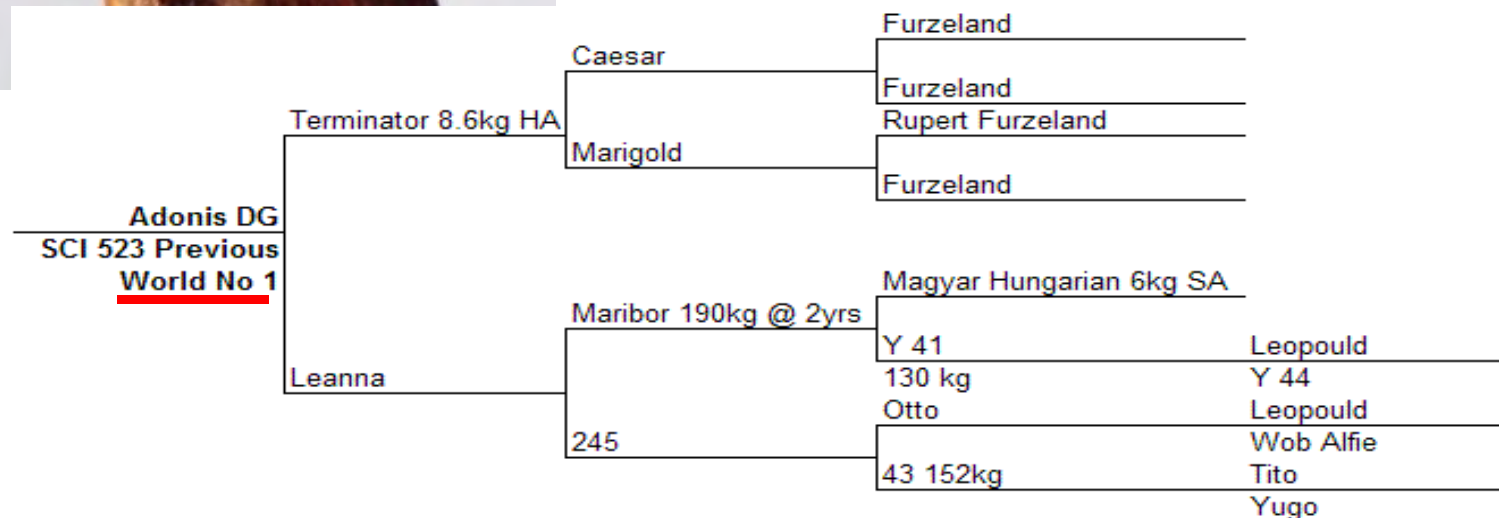
(種鹿精液資訊)



SCI 523 Previous **World No. 1** @ 6yrs

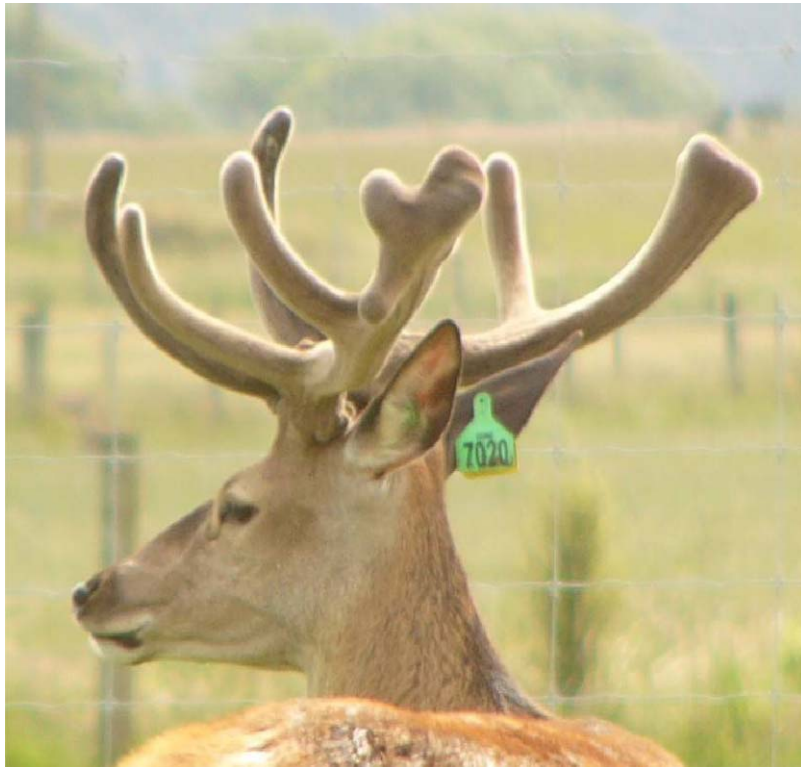
Adonis Son NZ open Velvet Champion

Early maturing sons scoring 400+ @ 4yrs



http://www.deergeneticsnz.co.nz/site/deer/files/images/Catalogues/2009/semen_catalogue/Page%202%20Adonis%20DG.pdf

Lot: 1 Tag: 7020 Age: 2yr (活體公鹿交易資訊)



BREEDERS COMMENTS

Spiker: 5x7, huge brows, XL tops, prominent trez, good beam, XL base, 29.5MB

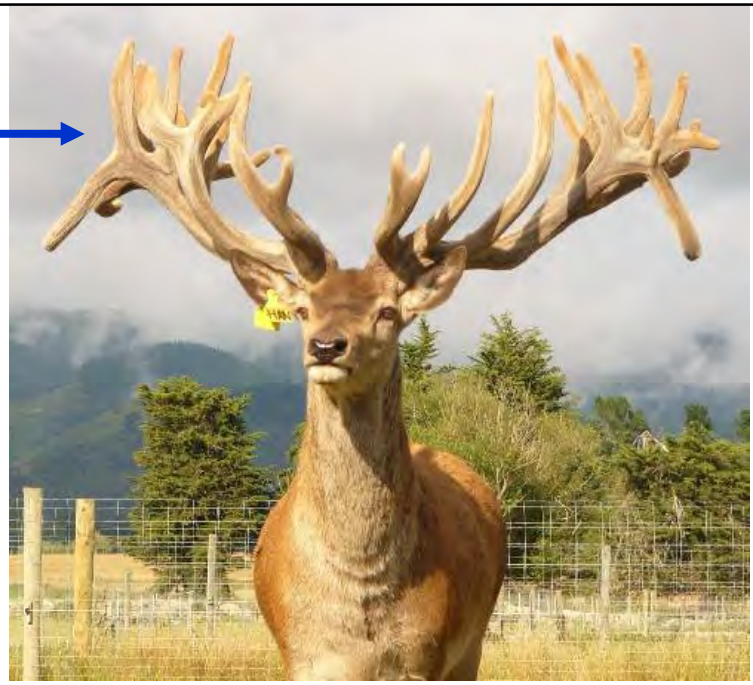
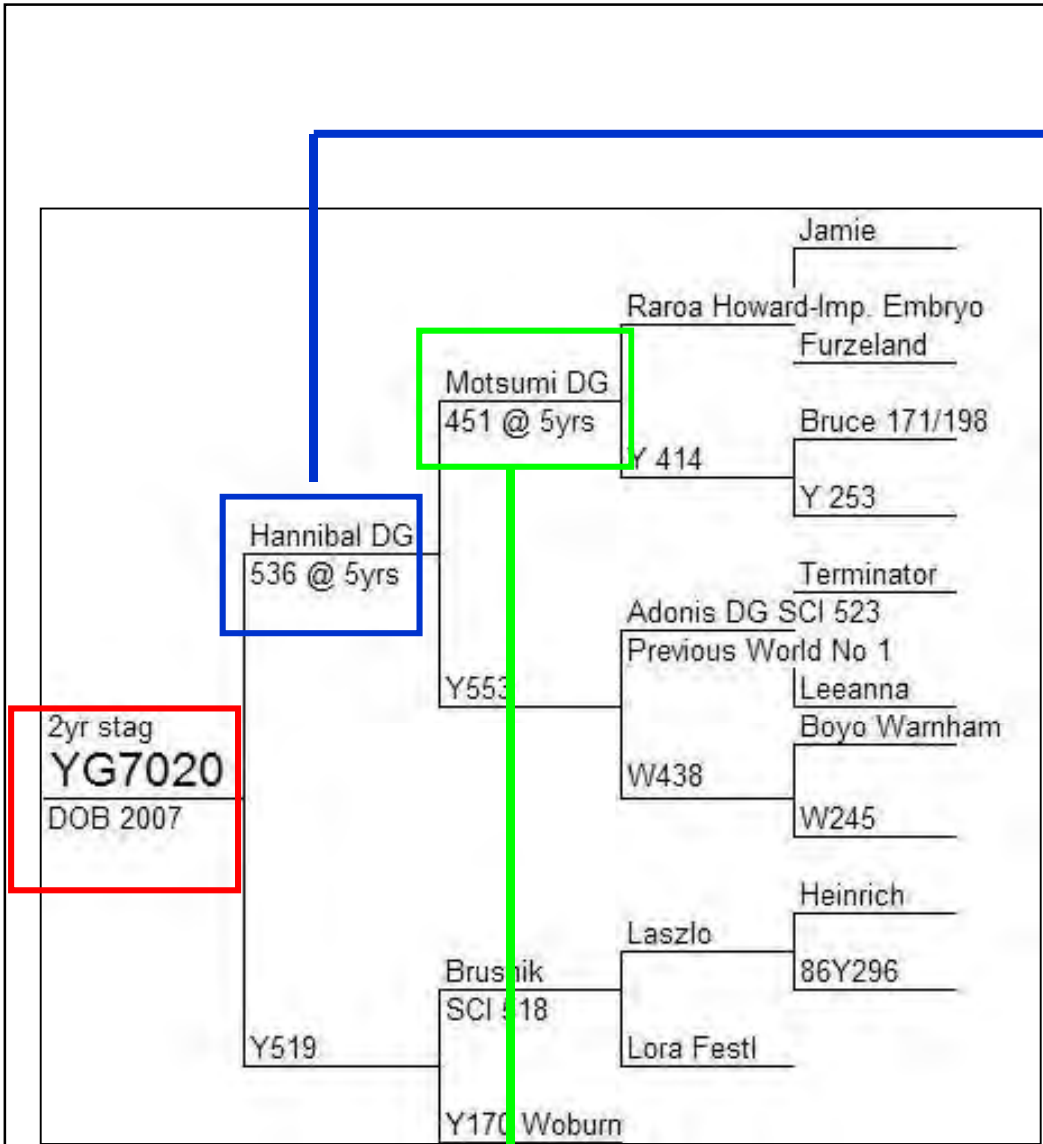
2yrs: Only 2yr on offer today over 200kg. Very quiet in the deer shed. Hannibal DG over Brusnik should be a great cross. Width, length, drop tine, beam and body.

Age: 2yrs

Weight: 202kgs 14 Dec 09

Sale day weight:

From: <http://www.deergeneticsnz.co.nz/Deer+Sales.html>



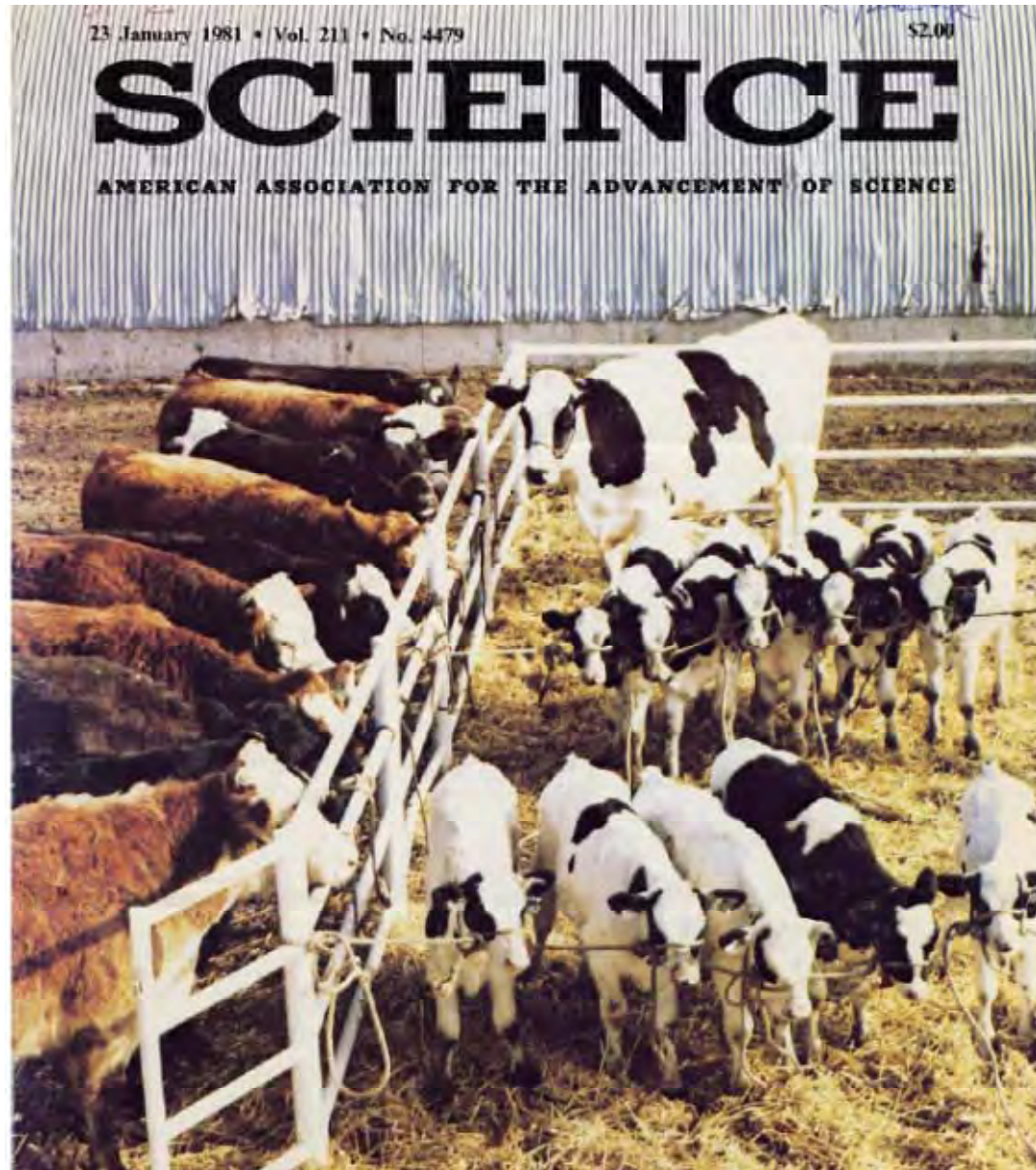
Hannibal DG 536 @ 5yrs



Motsumi DG 451 @ 5yrs

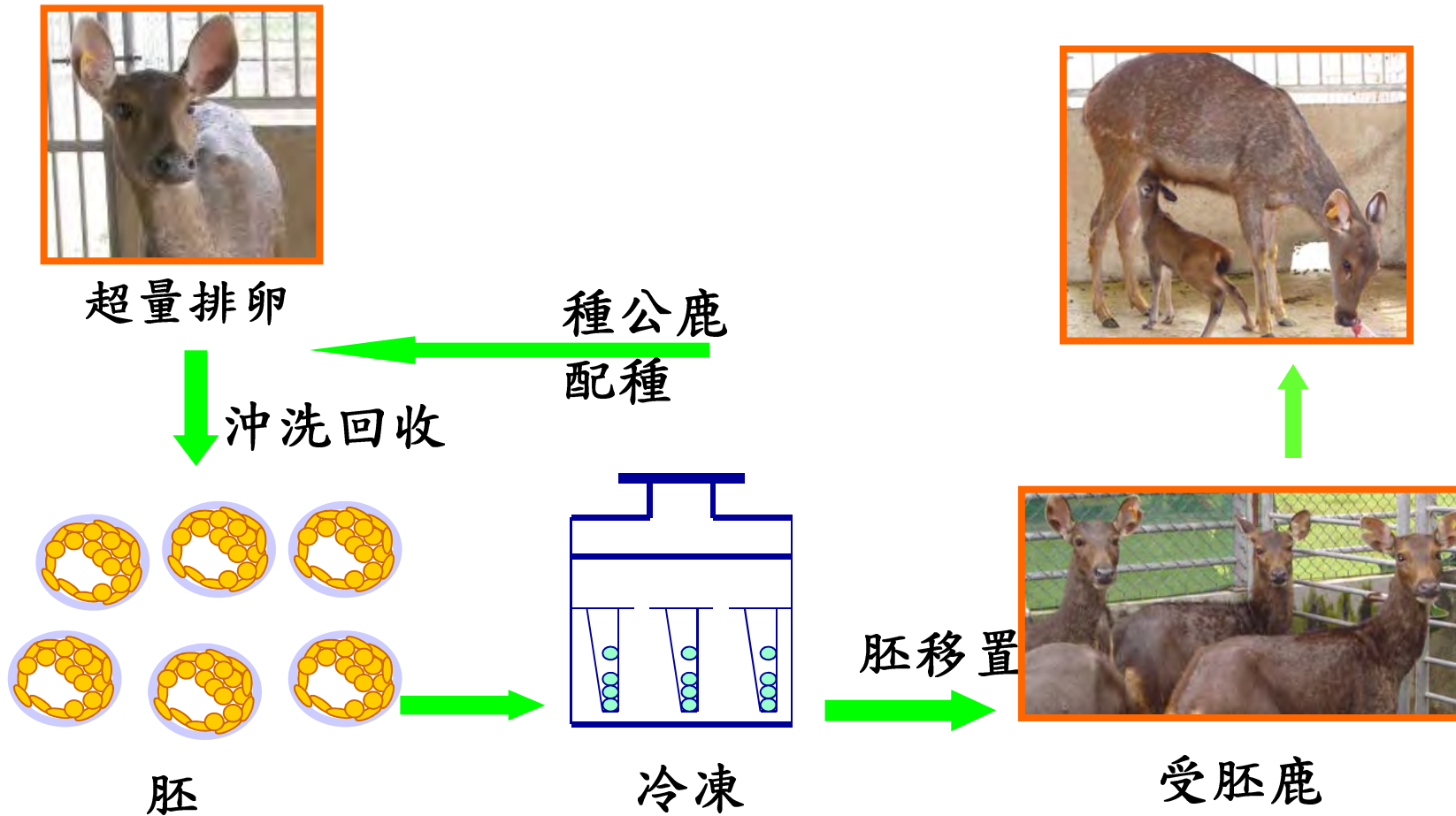
第二階段：95 - 100年

- 1、母鹿超量排卵與胚回收技術。
- 2、水鹿胚玻璃化冷凍與胚移置技術。



1981

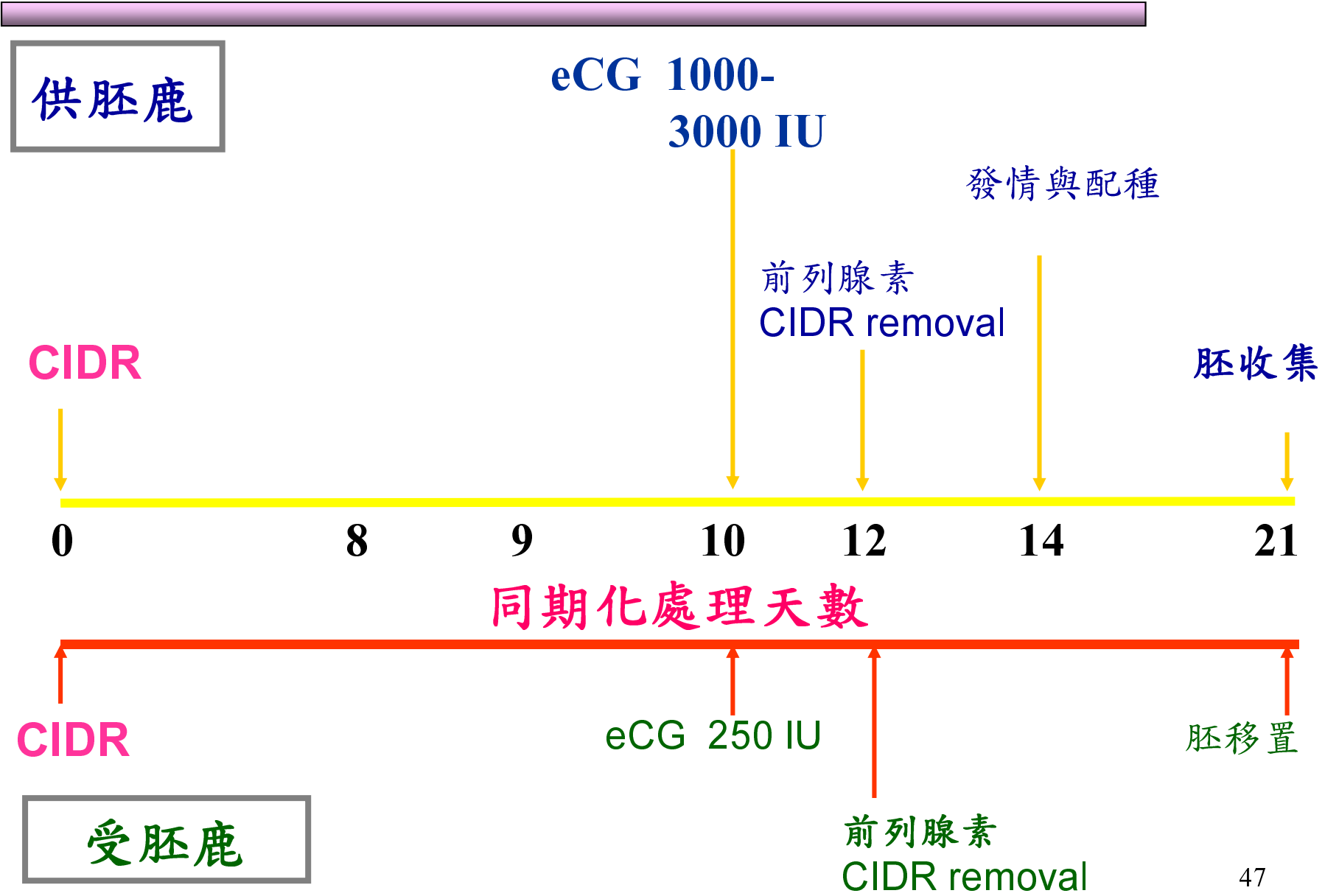
母水鹿超量排卵、胚回收、冷凍與移置技術



胚移置(embryo transfer, ET)原則

- 供胚者與受胚者一致性
 1. 分類學
 2. 生理同步
 3. 解剖部位
- 胚發育的期限
- 胚品質
- 供胚與受胚者健康與生理狀況

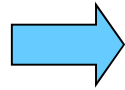
超量排卵 與 發情同期化



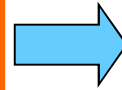
水鹿胚收集



保定鎮靜



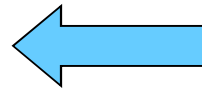
消毒



腹中線手術



子宮角沖洗回收



觀察卵巢與子宮角

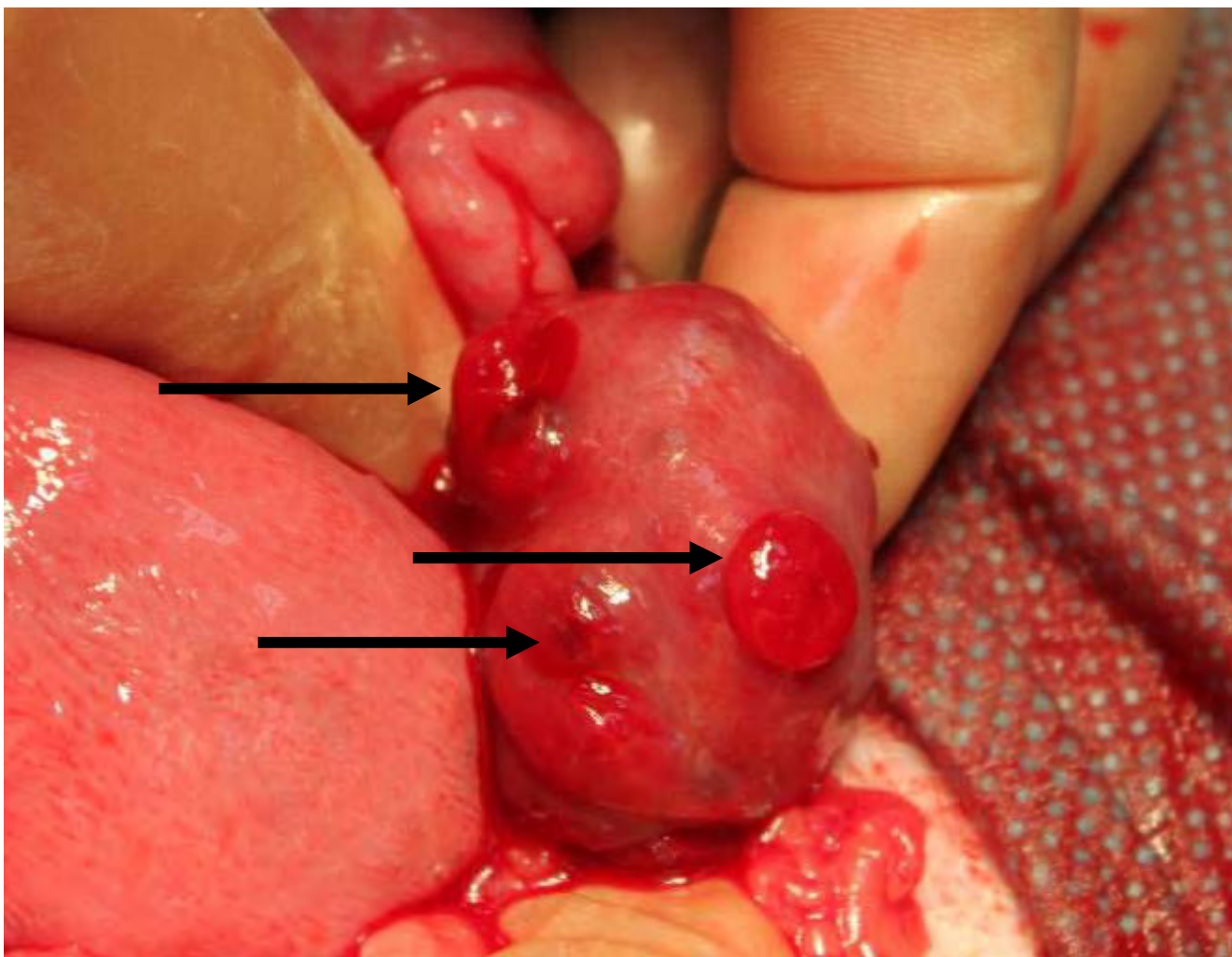


圖. 經超量排卵處理母水鹿配種後第4天之卵巢外觀

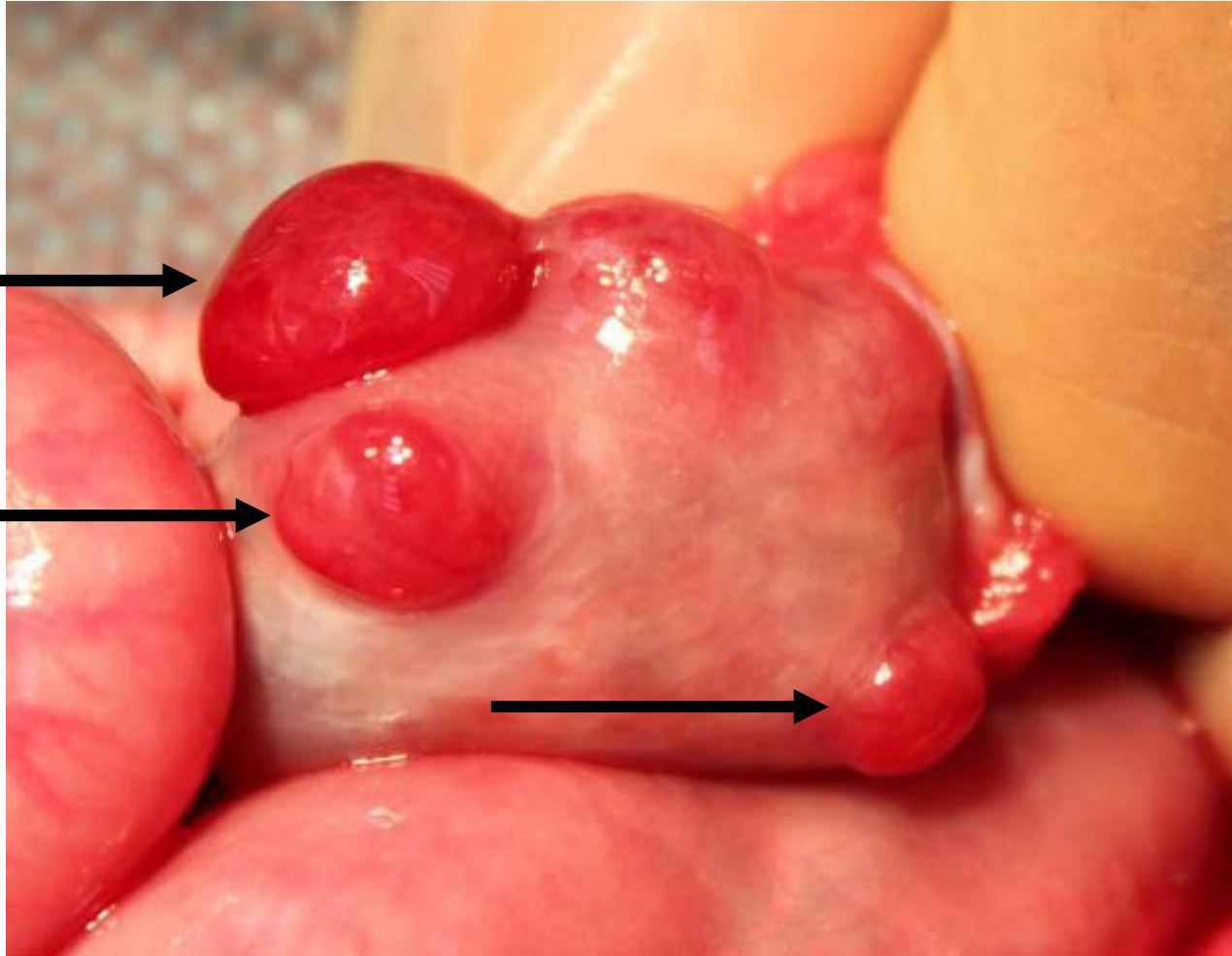


圖. 經超量排卵處理母水鹿配種後第7天之卵巢外觀

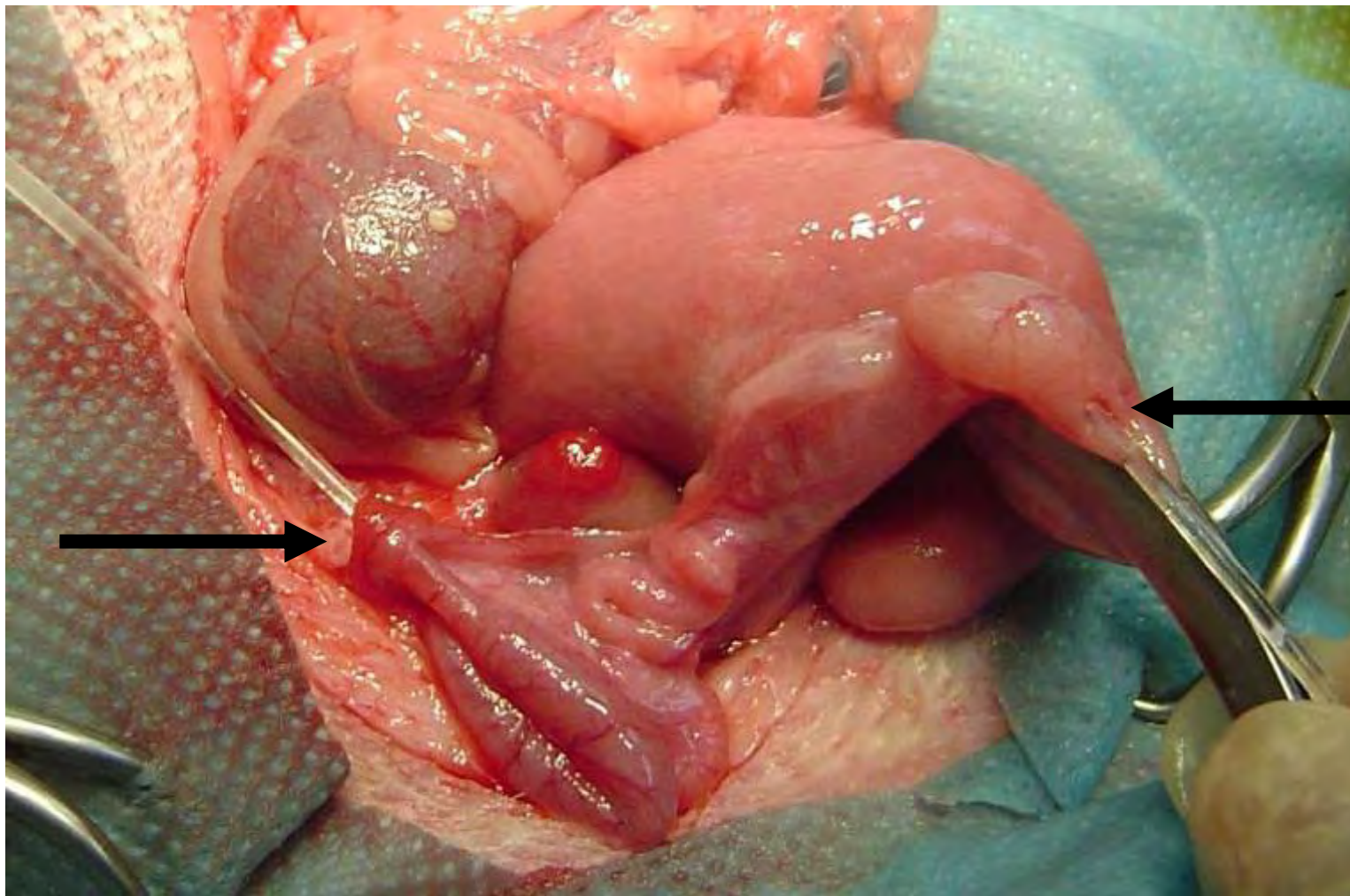
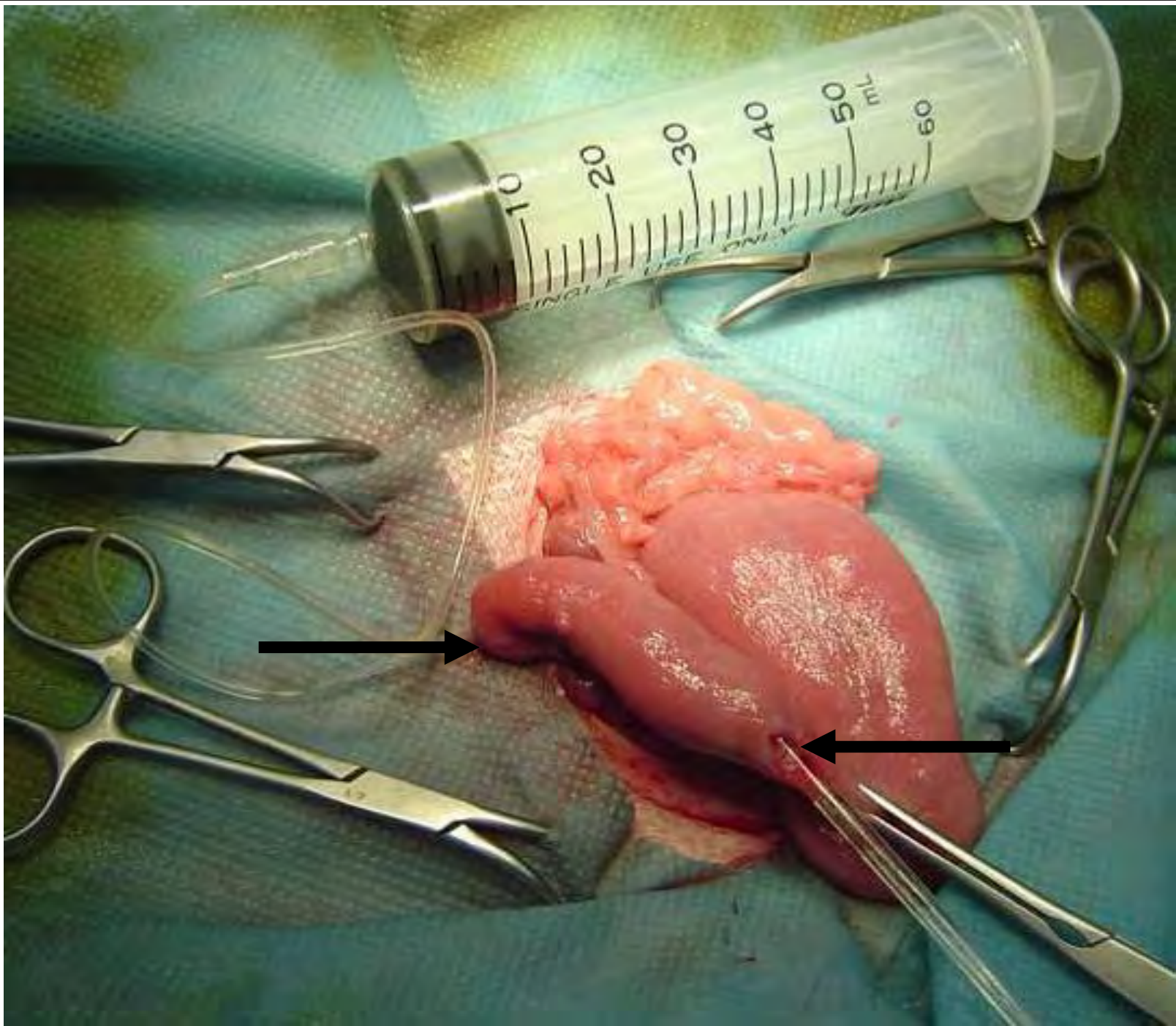


圖. 超量排卵處理母水鹿配種後第4天經由輸卵管回收胚



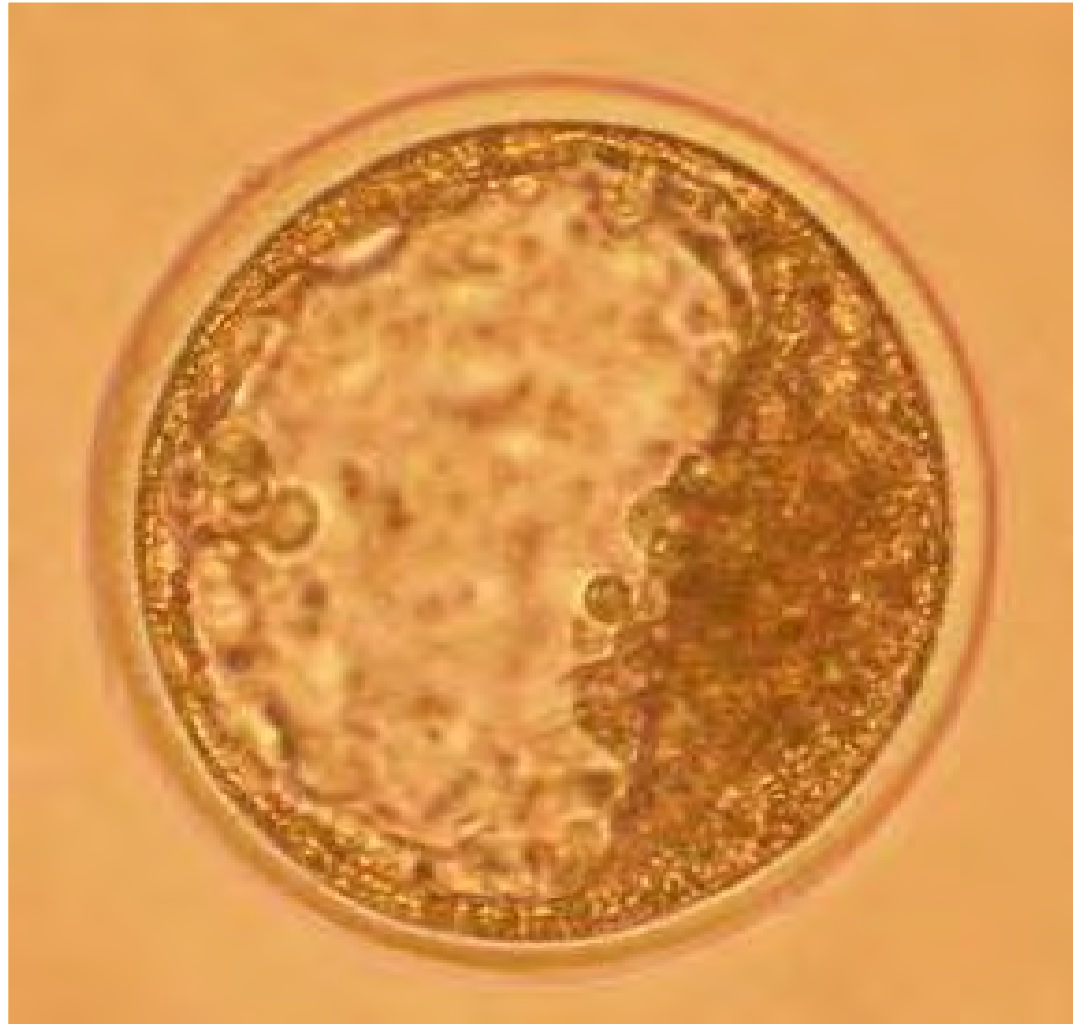
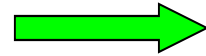


圖8 經超量排卵處理配種後第7天收集之水鹿囊胚。



鹿 胚 移 置 流 程

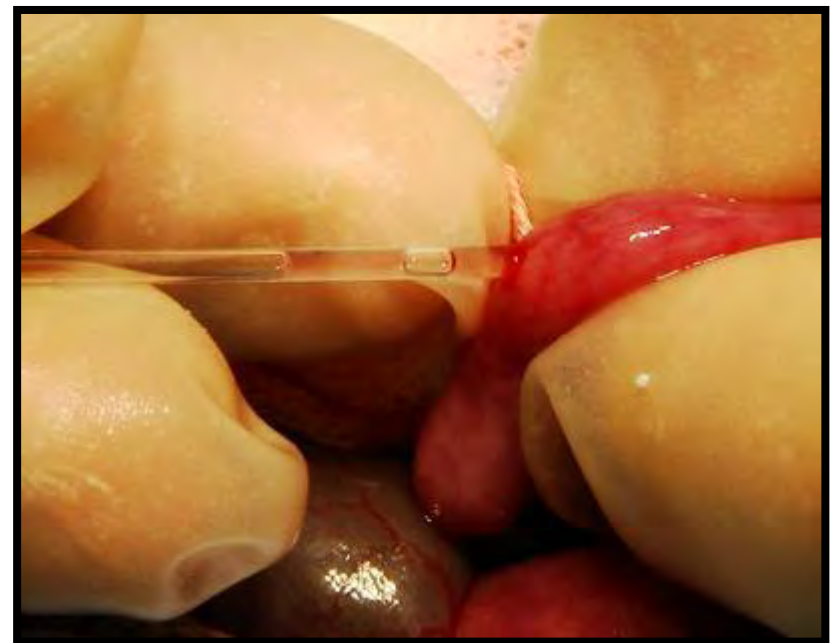
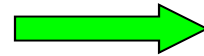
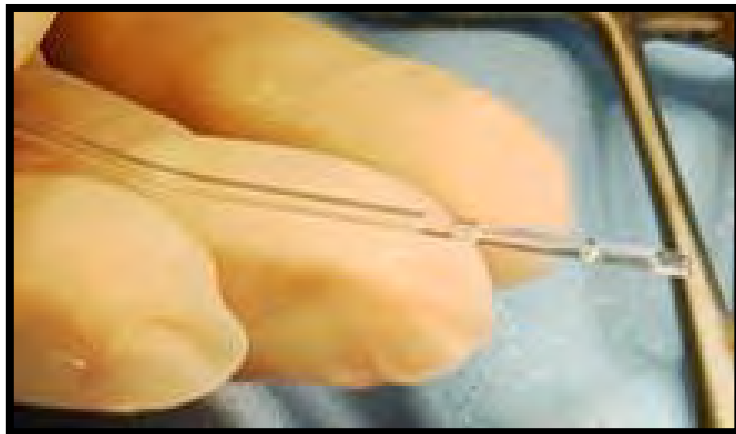
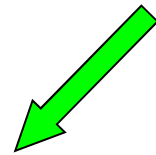


表. 不同 eCG 劑量對台灣水鹿超量排卵處理後
卵巢反應之影響 (96至97年)

	2000 IU	3000IU
處理頭數(頭)	9	10
平均黃體數量(個)	9.2	5.4
平均大濾泡數量(個)	2.7	2.8
胚回收率(%)	12	31.5

表 eCG處理劑量對母台灣水鹿超量排卵效率之影響 (99年)

	1,000 IU	1,500 IU	2,000 IU	3,000IU
處理頭數(頭)	2	4	5	4
平均黃體數 X	3.5	7.25	10.6	8.5
胚回收率 (%)	85.7 ^a	62.0 ^b	25.5 ^c	5.8 ^c
(胚/黃體)	(6/7)	(18/29)	(12/47)	(2/34)



圖. 經玻璃化冷凍-解凍後於體外培養後之水鹿胚 (h); 0(A), 2 (B).
Bar=50 μ m.



圖. 第一頭應用玻璃化法產製之冷凍胚進行移置後
所產下之台灣水鹿-小璐(20070416)



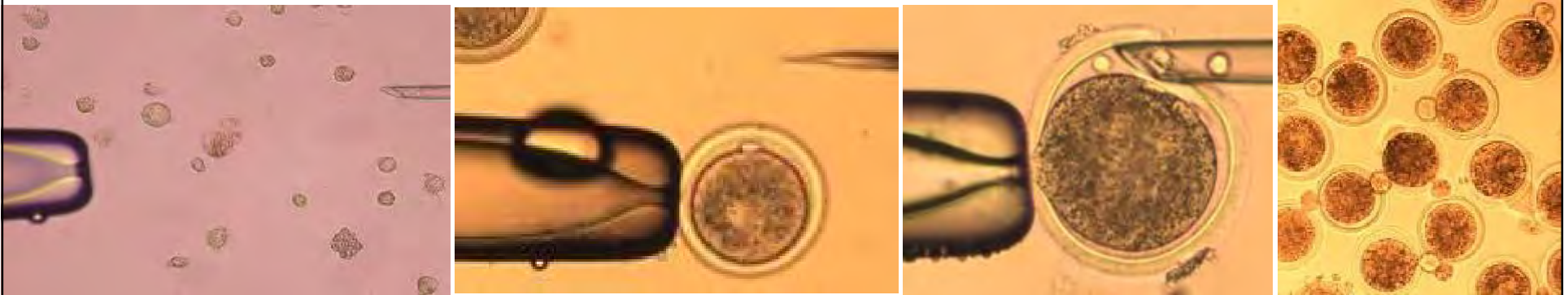
圖. 早期胚經體外培養發育至囊胚, 應用玻璃化法產製之冷凍胚進行移置後所產下之台灣水鹿(2011)

為什麼進行胚移置？

- 充分發揮優良母畜繁殖能力
 1. 縮短繁殖週期
 2. 增加排卵數
- 提高育種效率
 - 提早進行後裔測定
- 保存品種資源與提升全球遺傳資源交換
- 有助於其他研究應用

第三階段：

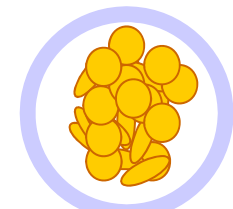
- 第三階段
 - 水鹿選性精液與胚性別鑑定(99年開始發展)
 - 水鹿體外胚生產(99年開始發展)
 - 胚卵基因分析
 - 複製與基因轉植



水鹿胚性別鑑定

公、母台灣水鹿AML基因序列間之差異性為71%

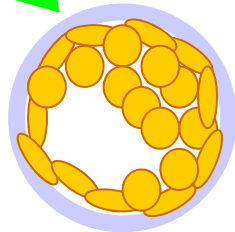
性別鑑定 used PCR



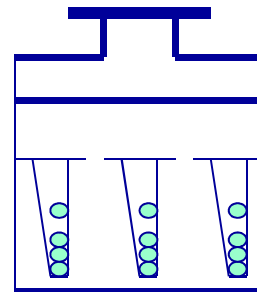
桑葚胚

顯微抽吸細胞

體外培養



囊胚



冷凍保存

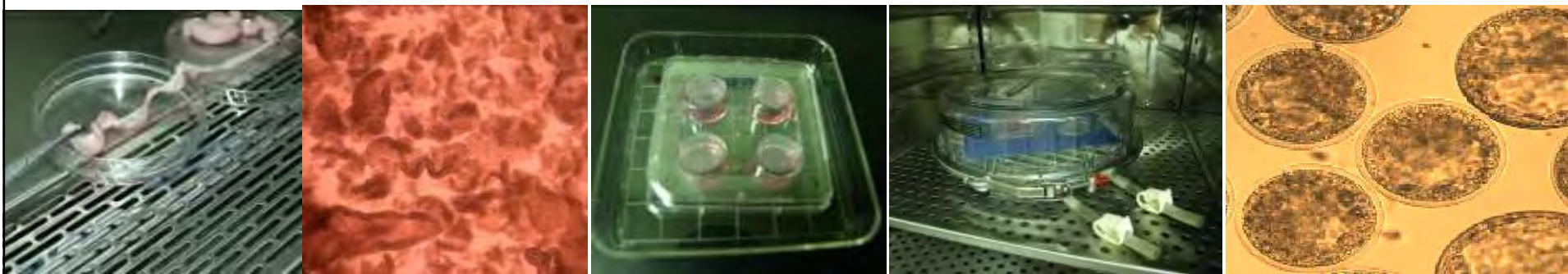
胚移置



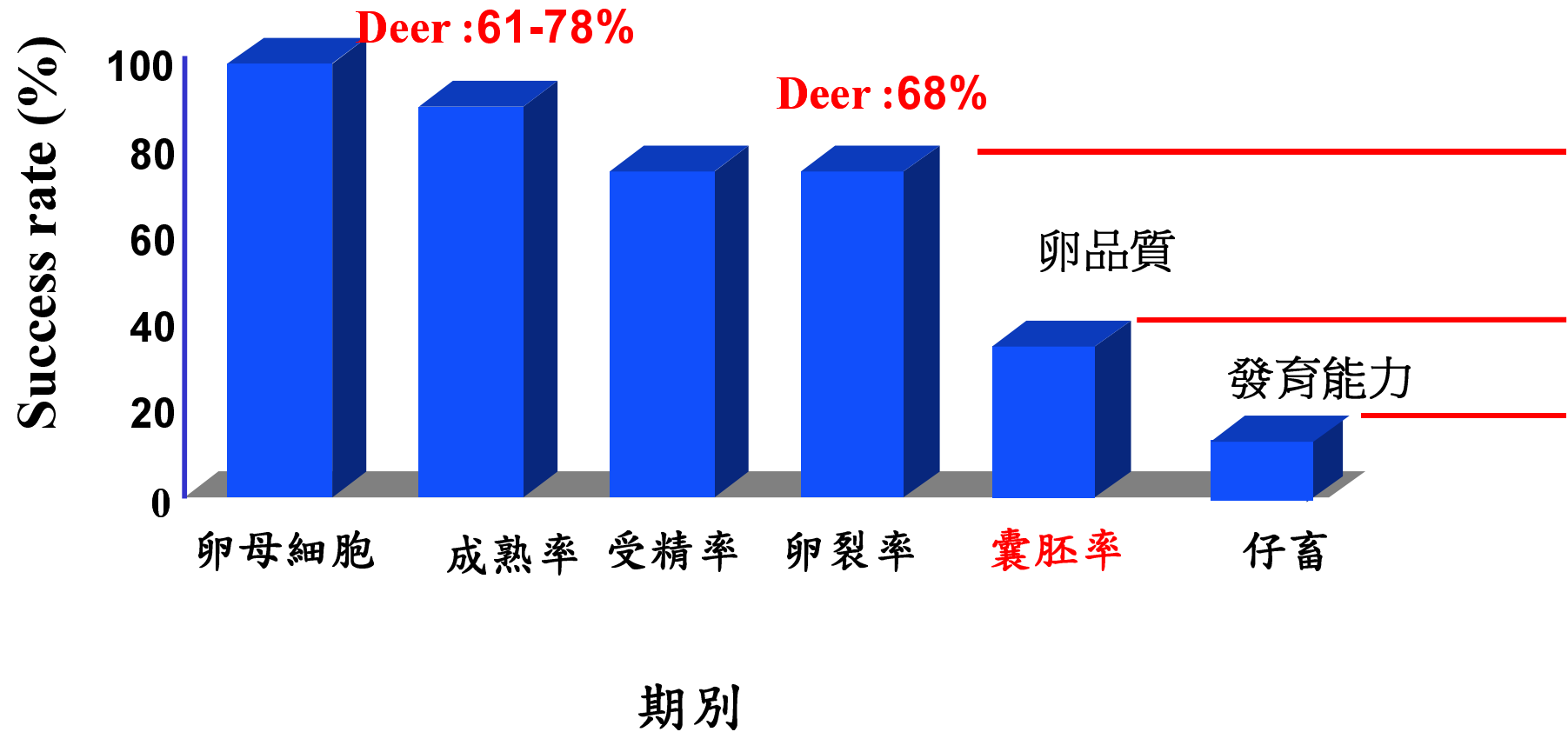
受胚鹿

水鹿胚體外培養生產

- 卵丘卵母細胞複合體收集(未成熟卵)
- 體外成熟
- 體外授精
- 體外培養

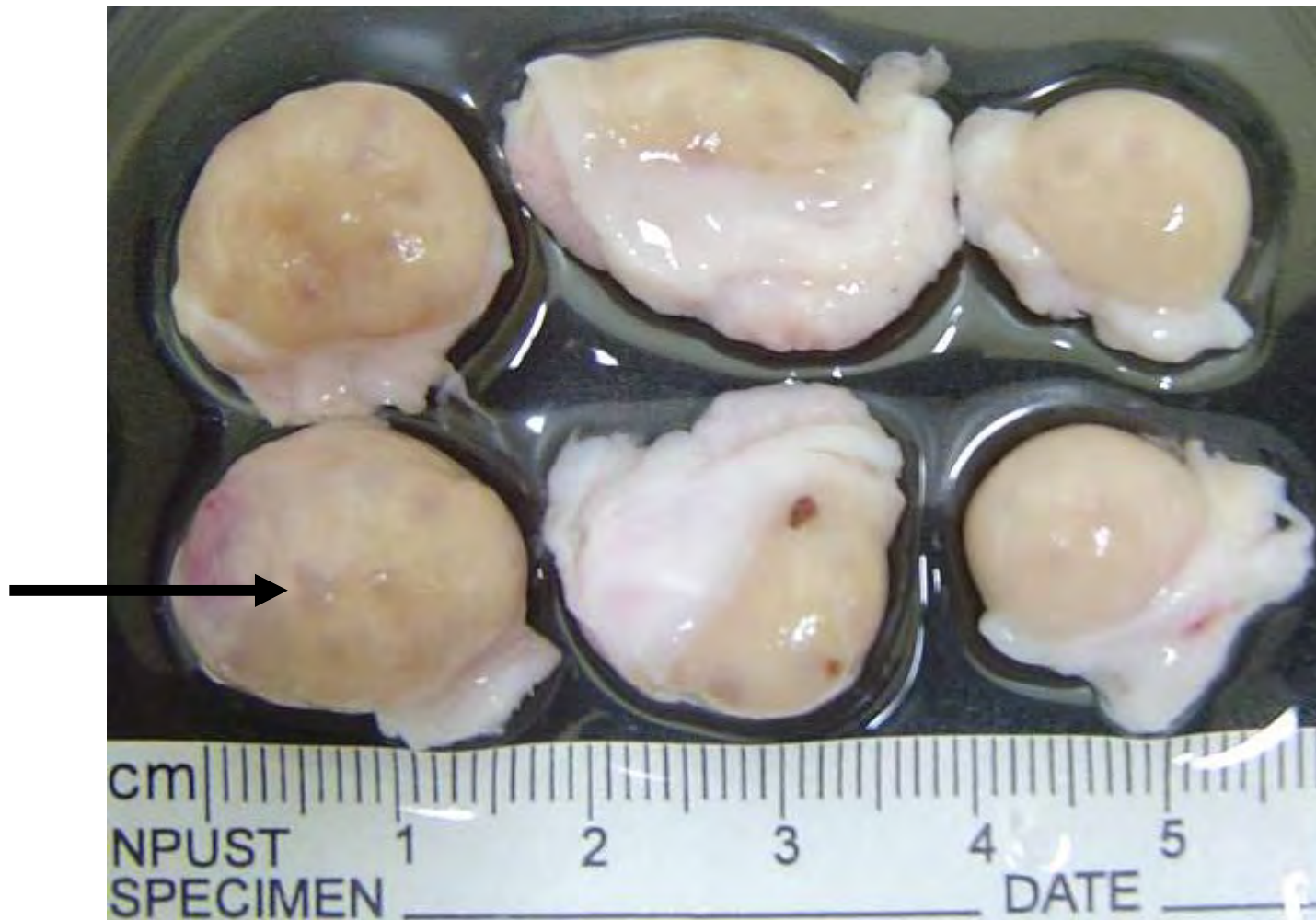


成熟體外生產技術之成功率

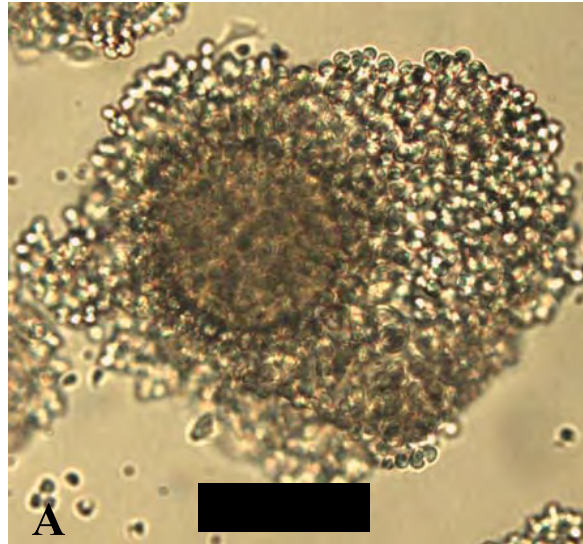


(Mermillod *et al.*, 2006)

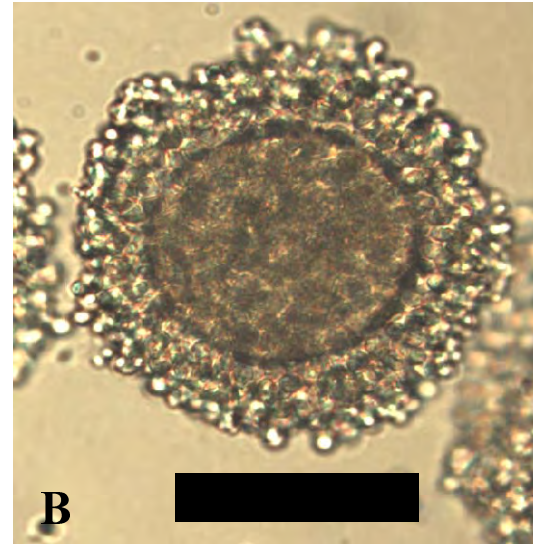
卵丘卵母細胞複合體收集



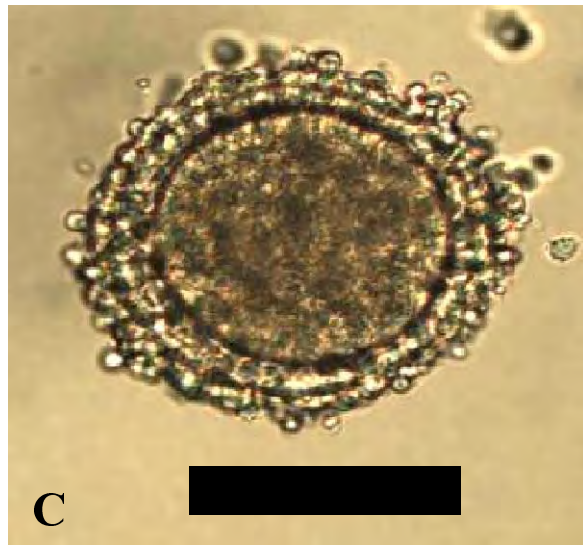
一級



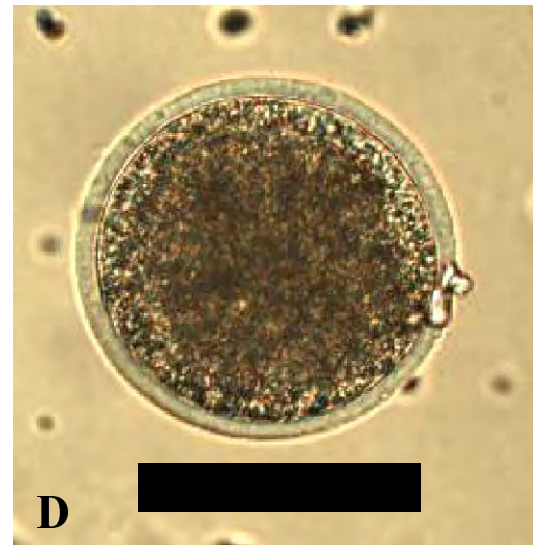
二級



三級



四級



卵巢數目

一與二級卵丘卵母
細胞複合體數目

三與四級卵丘卵母
細胞複合體數目

38

60 (1.57)

74 (1.94)

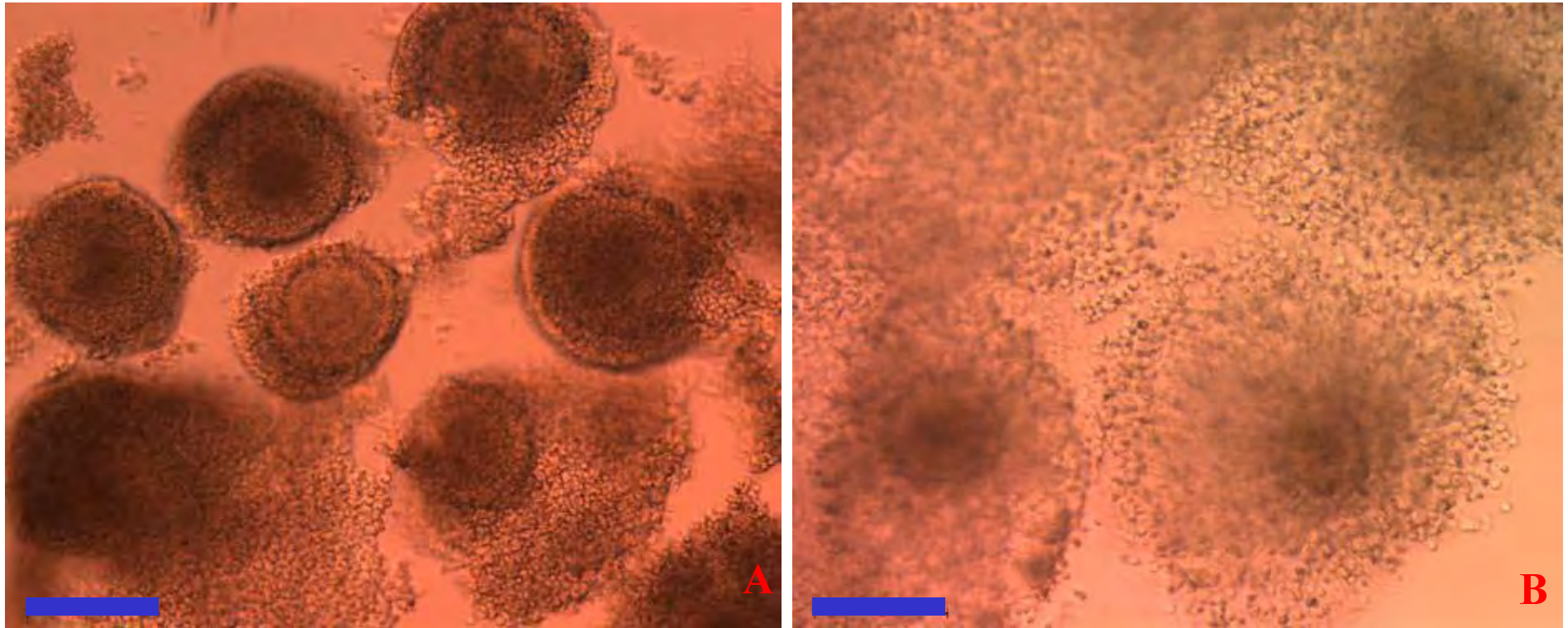


圖. 卵丘卵母細胞複合體(A)經體外成熟培養24 h 後外觀形態(B) Bar = 200 μm .

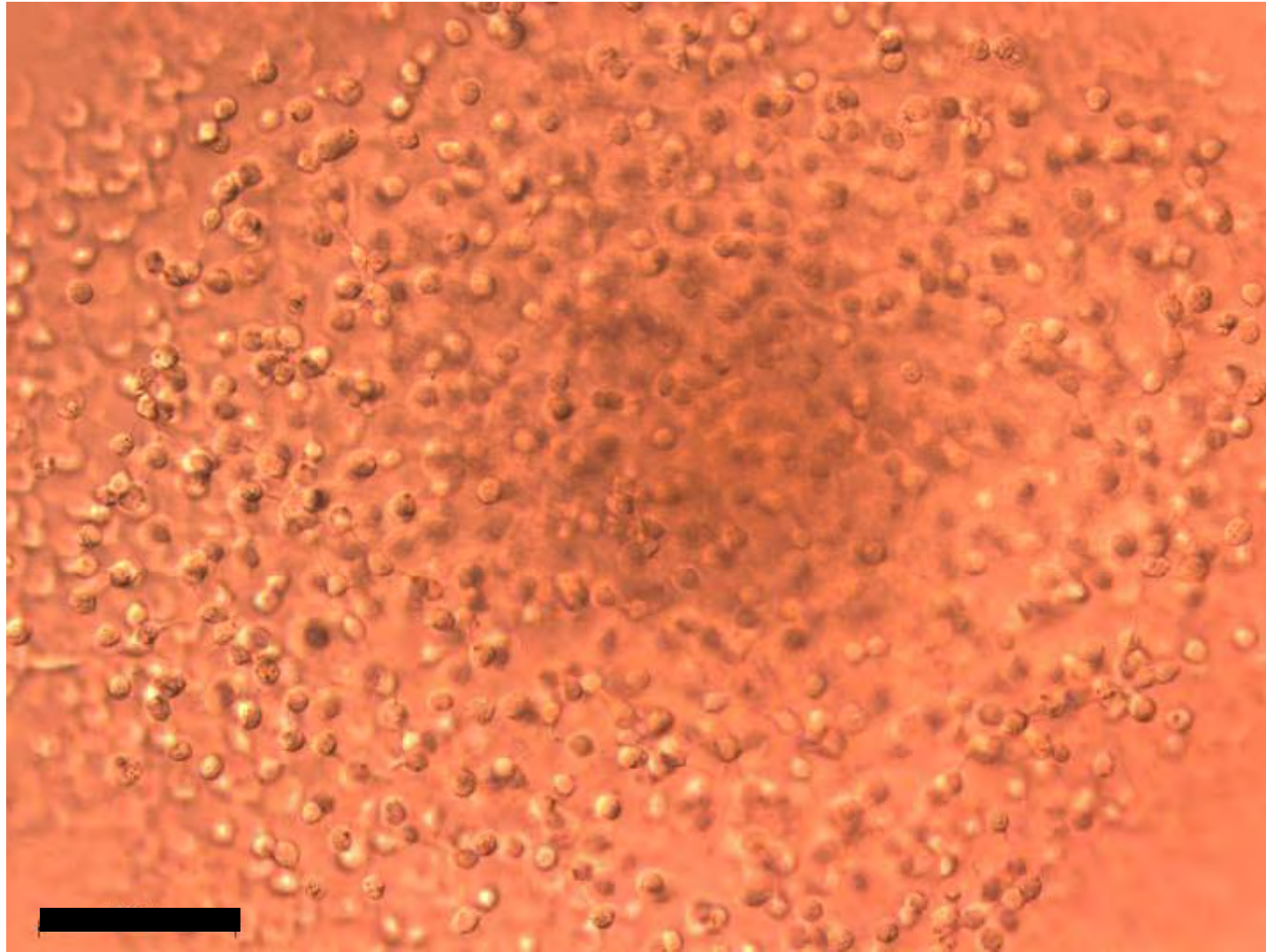


圖. 台灣水鹿卵丘卵母細胞複合經體外成熟培養24 h後。
Bar = 100 μm .

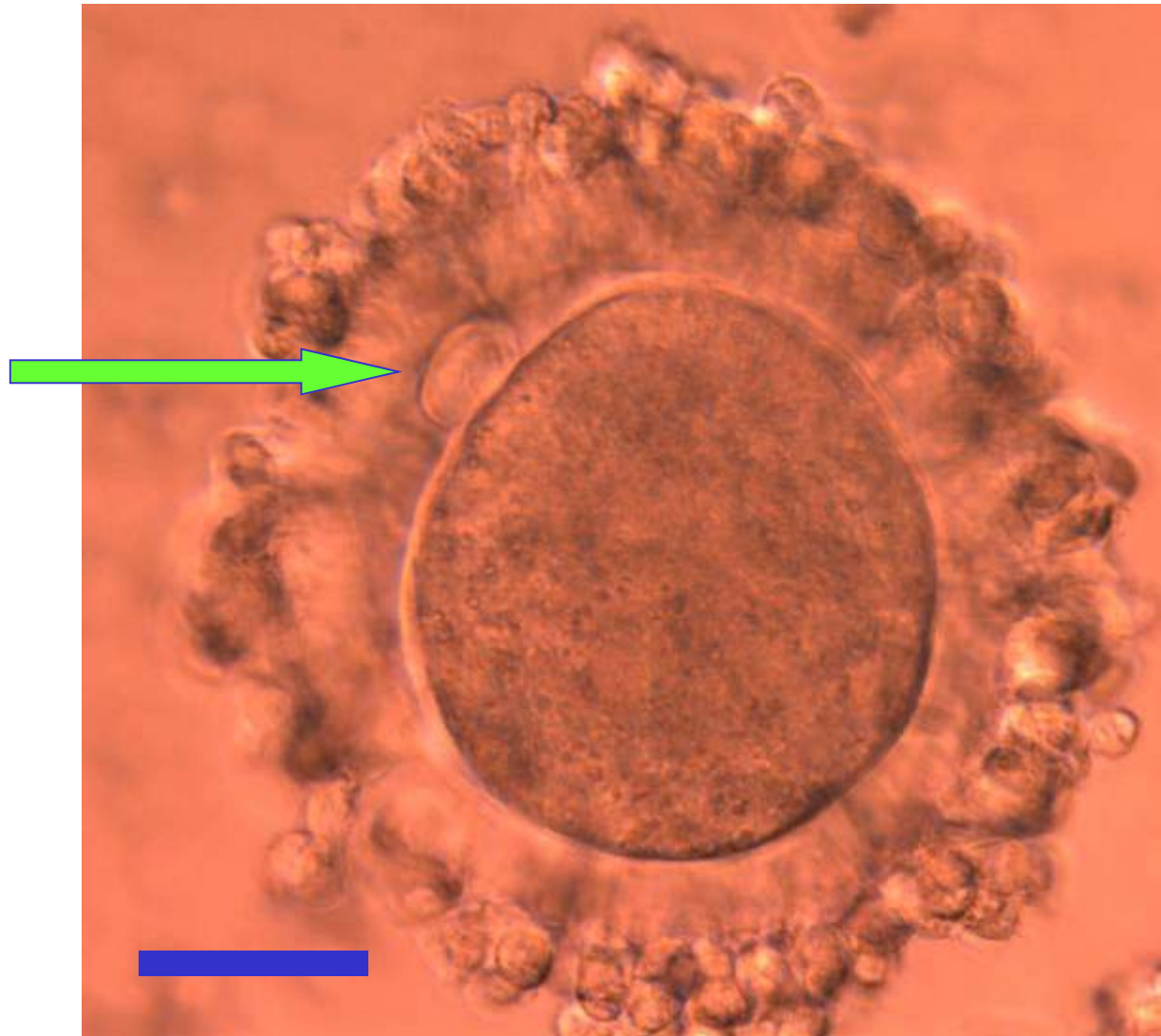


圖. 經體外成熟培養之台灣水鹿卵母細胞.

→ 第一極體. Bar = 50 μ m.

Table 6 Effects of oocytes class on the *in vitro* maturation rates of Formosa sambar deer oocytes

Oocytes class	No.(%) of oocytes	體外培養成熟率
I ⁽¹⁾ and II ⁽²⁾	23	14 (60.8) ^a
III ⁽³⁾ and IV ⁽⁴⁾	23	5 (21.7) ^b

^{a, b} Values without same superscripts in the same column are significantly different (P < 0.05) .

(1) Oocytes with evenly granulated cytoplasm surrounded more than three layers of cumulus cells(Grade I); (2) Oocytes surrounded with one or two layers of cumulus cells(Grade II); (3) Partially denuded oocytes(Grade III); (4) Completely denuded oocytes(Grade IV).

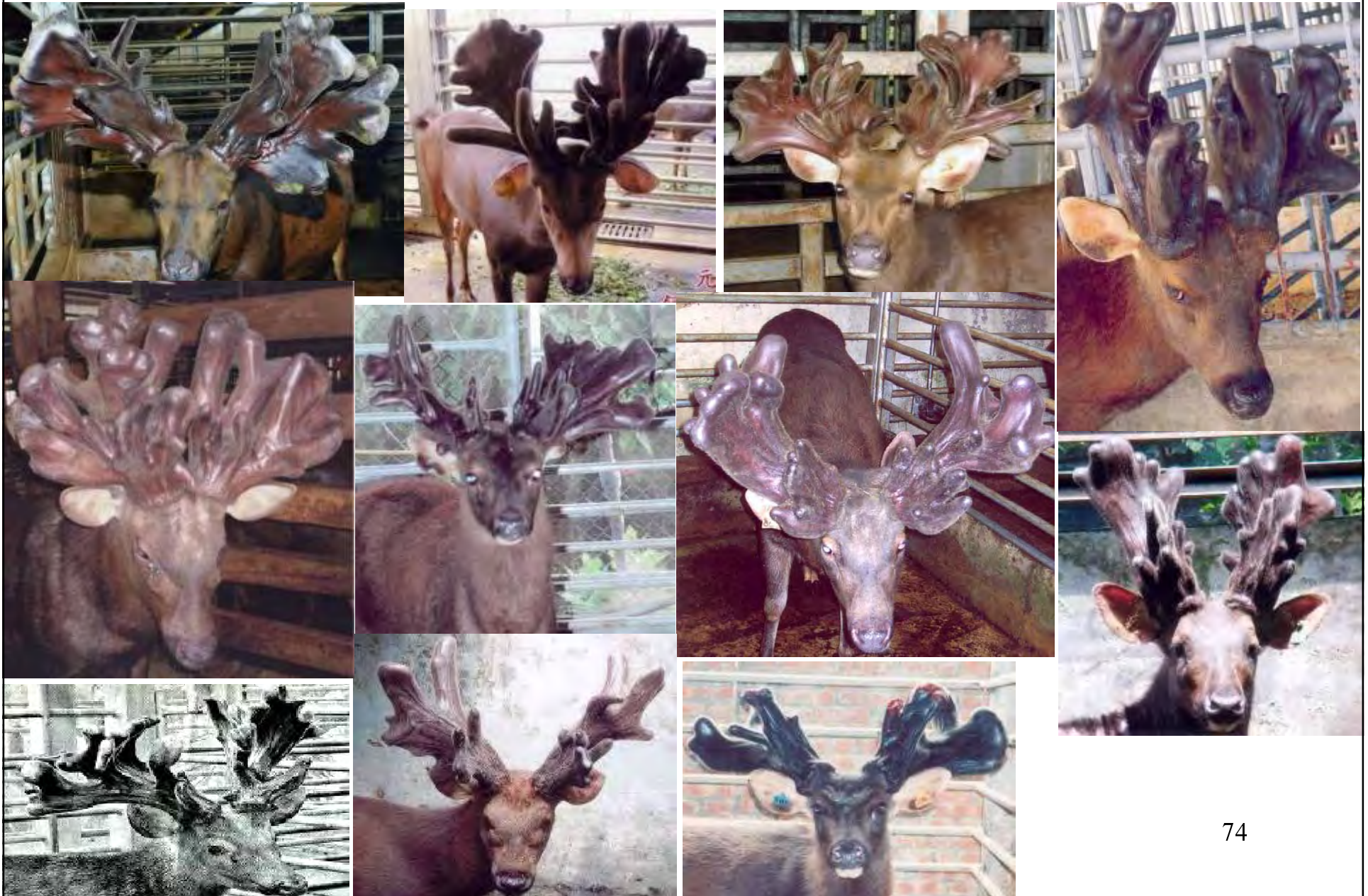


圖.台灣水鹿卵母細胞於體外授精
Bar = 100 μm .



圖. 台灣水鹿胚經體外授精後第二天發育至2-細胞階段之形態
Bar = 50 μm .

未來



鹿隻人工生殖服務團隊

LRI

王治華 場長

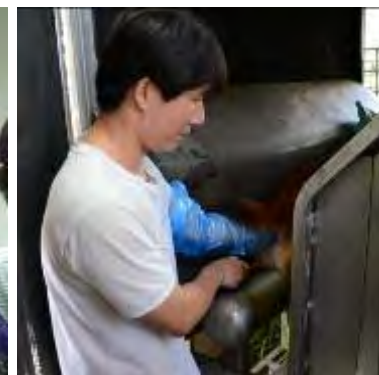
康獻仁 主任

宋文霖

曾進輝

鄭木榮

林信宏





謝謝
敬請指教

LRI