

## 出國報告（出國類別：研究）

# 山羊人工生殖技術研習

服務機關：行政院農業委員會畜產試驗所恆春分所

姓名職稱：王得吉助理研究員

派赴國家：法國

報告日期：97年10月14日

出國時間：97年8月2日至97年8月14日

## 摘 要

恆春分所過去雖然研發與輔導民間乳羊場之人工授精技術，其間也曾邀請法國 CAPRI-IA 之專家前來指導相關技術，然而，無論是由法國專家之示範，或由我方技術人員之操作，無論是在所內或所外實施，目前仍遭遇母羊受胎率偏低或個別養羊戶受精成績不穩定之情形。本計畫目的為派遣研究人員進行出國研習人工生殖技術，以培訓種子技術人員，使國內在山羊人工生殖相關技術上能有所突破，提昇國內山羊種原之性能與乳羊產業國際競爭力。此外，在短暫訪問法國國家農業研究院之 Tours 分所中的家畜生殖中心後，在山羊人工生殖技術方面，則有助於互相瞭解目前研究重點與未來動態，進一步於未來規劃國際合作之方向與模式。

## 目 次

壹、目的 .....	1
貳、過程 .....	2
參、心得 .....	11
肆、建議 .....	12
伍、相關附錄 .....	13

## 壹、目的

多年以來，恆春分所持續執行山羊育種及生殖技術等科技計畫之結果，已在種公羊體型鑑別、配種適合度(breeding soundness)檢定、母羊發情同期化、人工授精及胚移置等技術方面，累積極為豐富之經驗。其中，精液之採取與性狀檢驗技術已例行應用於冷凍精液之生產體系；母羊應用助孕素、前列腺素  $PGF_{2\alpha}$  及馬絨毛膜激性線素(eCG)進行發情同期化可獲得 90%以上之發情率及平均 230%之產仔率；胚移置之受胎率則高達 85%以上。

然而，優良種原是產業維持國際競爭優勢最重要之籌碼，在乳用畜群中，不斷採用經後裔檢定之種公畜所生產冷凍精液，以人工授精方式持續進行母畜群性能改良，乃是改良種原之必要手段。本省雖為亞熱帶型氣候，但山羊的繁殖現象仍與溫帶地區羊隻類似，屬於季節性生殖家畜(season breeder)，表現季節性生殖的情形明顯。繁殖季節集中在秋季 9 月至隔年 2 月間，春季 3~6 月則為乏情非繁殖季節，不僅延長母羊胎距及降低生殖效率，且因集中於秋季配種結果，母羊分娩季節亦集中於春季或夏季，造成夏季乳量集中，交乳困難，乳價低廉，而冬季乳量少，乳價高昂的季節性供需失調，嚴重影響乳羊產業經營效益。為解決非繁殖季節母羊發情配種的問題，及應用優良公羊冷凍精液做乳羊群遺傳改良的目的，使用外源性內泌素 CIDR、PMSG、PG 等處理母羊，為發情同期化常被使用的方法(Baril et al., 1993；Fukui et al., 1993；Garner, 1991)。恆春分所過去雖然研發與輔導民間乳羊場之人工授精技術，但在非繁殖季節誘導母羊發情並進行人工授精，所得人工授精平均受胎率僅為 23.4%，難於普遍應用於農民羊場，相對於法國近年來人工授精受胎率達 65%之成績(Baril et al., 1993)，實有改進國內乳羊人工授精技術之必要。儘管其間也曾邀請法國 CAPRI-IA 之專家前來指導相關技術，然而，無論是由法國專家之示範，或由我方技術人員操作，無論是在所內或所外實施，目前仍遭遇母受胎率偏低或個別養羊戶受精成績不穩定情形，導致近年來分所在執行農委會羊鹿產銷計畫中有關乳羊人工授精輔導時，面臨羊農參與意願低落及授精頭數難以成長之困境，對往後國內乳羊人工授精技術推廣與普及化，具有極為負面影響，亟待儘早培訓技術人員，重新建立羊農對人工授精技術之信心。

## 貳、過程

日期	研習機構	研習內容
8/2(週六)		去程
8/3(週日)		抵達法國 Poitiers 市
8/4(週一)	法國 Poitiers 市之 CAPRI-IA 機構	CAPRI-IA 之負責人 Mr. Pascal Boue 引導參觀該機構及進行山羊人工授精相關原理與應用技術之介紹。
8/5(週二)	法國 Poitiers 市之 CAPRI-IA 機構	CAPRI-IA 之負責人 Mr. Pascal Boue 進行山羊人工授精相關原理與應用技術之介紹。
8/6(週三)	法國 Poitiers 市郊區之農場	跟隨資深技術員 Mr. M. Freleteau 至一般羊農飼養戶進行山羊人工授精研習與實際操作。
8/7(週四)	法國 Poitiers 市郊區之農場	跟隨資深技術員 Mr. M. Freleteau 至一般羊農飼養戶進行山羊人工授精研習與實際操作。
8/8(週五)	法國 Poitiers 市郊區之農場	跟隨資深技術員 Mr. M. Freleteau 至一般羊農飼養戶進行山羊人工授精研習與實際操作。
8/9(週六)		資料整理
8/10(週日)		資料整理
8/11(週一)	法國 Poitiers 市郊區之法國國家農業研究院 (INRA) 分所	與 Dr. Bernard Leboeuf 進行山羊人工授精經驗之交流。
8/12(週二)	法國 Tours 市郊區之法國國家農業研究院 (INRA) 分院	參觀 Tours 分院之家畜生殖遺傳中心及與中心人員進行山羊人工生殖技術經驗交流。
8/13(週三)		回程
8/14(週四)		回程

- 一、本分所畜產科技系王得吉助理研究員於 97 年 8 月 2 日由高雄小港機場搭乘華信航空班機於 8 月 2 日抵達香港,隨即轉機於 8 月 2 日抵達法國戴高樂機場並進駐旅館 8 月 3 日由巴黎 Montparnasse 車站搭乘 TGV 高速鐵路至 Poitiers 市,下午抵達並進駐當地旅館後準備 8 月 4 日訓練班資料。
- 二、8 月 4 日開始進行為期 5 天之山羊人工授精訓練。本次訓練班除王得吉助理研究員外,尚有來自以色列之 3 名養羊農民及 1 名獸醫師(圖 1)。第一天由 CAPRI-IA 機構(圖 2)之負責人 Mr. Pascal Boue 簡單介紹 CAPRI-IA 之機關屬性與簡短參觀機關內種公羊採精及冷凍精液製作流程。

法國為世界羊乳生產之第五大國,在 2004 年其全國產量達 525,000,000 公升。若從其乳羊產業結構來看,主要為撒能與阿爾拜因乳羊,全國共有 1,100,000 頭。其中約有 2000 群乳羊群(平均 160 頭乳羊/每群),包含 180000 頭阿爾拜因乳羊與 140000 頭撒能乳羊是具完整之泌乳記錄者,以此作為其全國乳羊育種改良之基礎羊群(圖 3)。CAPRI-IA 為一山羊人工授精之國際性合作組織,亦是世界上唯一之山羊冷凍精液生產中心,該組織每年產製約 250000 支冷凍精液,其主要任務為創造與擴散山羊之遺傳改進。CAPRIGENE 則為山羊育種者協會,目前共有 800 名會員。這些會員所擁有之 160000 頭乳羊則為該國育種選拔之核心羊群,該組織主要任務為在與 CAPRI-IA 合作之架構下進行法國山羊育種及選拔工作之管理(圖 4)。簡言之,由 CAPRIGENE 每年自核心羊群中選擇最優之公母畜,再和 CAPRI-IA 合作下進行約 1100 次的計劃性配種,並選擇最優之仔公畜約 200 頭至 CAPRI-IA 之精液生產中心,其中約 90 頭經衛生及型態檢測後被淘汰,剩餘者進入性能檢測站後,約 40 頭再經生長與性功能測定被淘汰,最後約 70 頭種公羊則進入後裔檢定。該群公羊中每頭逐年進行 200 次之人工授精,累積達 80 筆後代女羊之泌乳記錄後,經遺傳指數分析比較,最終每年約有 35 頭種公畜通過檢定並其所生產之冷凍精液才可供作全國羊群人工授精之用。



圖 1.山羊人工授精訓練班成員。



圖 2.CAPRI-IA 機構之外觀。

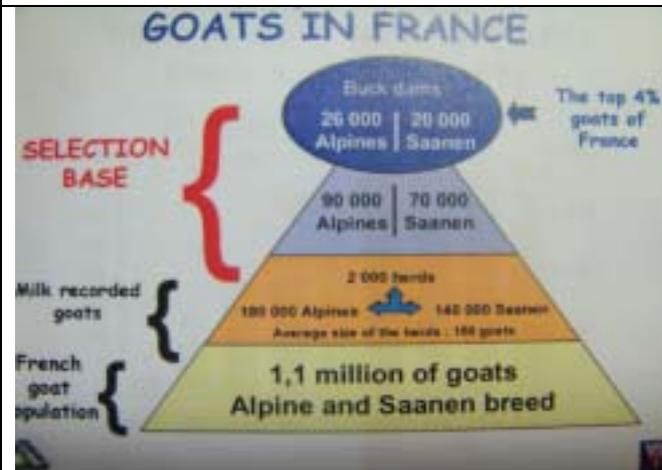


圖 3.法國山羊育種族群之形成。

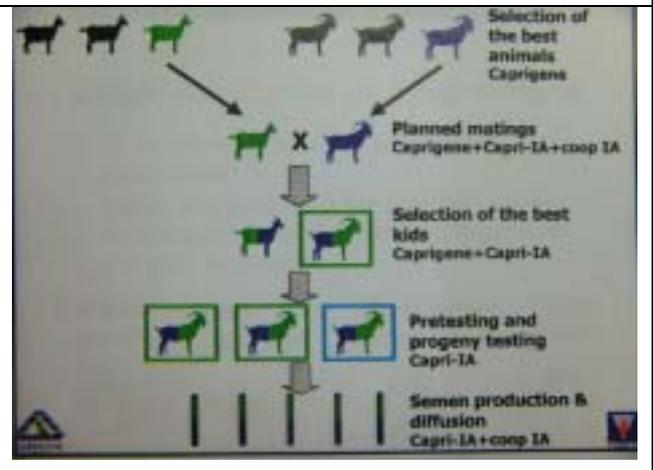


圖 4.法國山羊選拔過程中由 CAPRI-IA 與 CAPRIGENE 合作完成。

在山羊精液生產技術發展方面，如在自然繁殖季節中（6 個月/每年）進行公羊精液採集並製作成冷凍精液，每年每頭種公羊約可產製 727 支，現在其利用人工光照處理後，每年每頭種公羊約可產製 1590-1660 支。在山羊精液儲存技術發展方面，於 1975 年前是將採出之精液以脫脂乳稀釋後儲存於+4 下，但在 1975 年後則是將採出之精液以脫脂乳加甘油稀釋後儲存於-196 下。目前更進一步發展出將採出之精液先進行洗滌，再以脫脂乳加甘油稀釋後儲存於-196 下。若以不同儲存方式比較山羊人工授精之產仔率，儲存於+4 精液經人工授精後所得之產仔率約為 52.1 %，而儲存於-196 精液經人工授精後所得之產仔率約為 56.7 %。在山羊人工授精實施方式上，於正常繁殖季節中，在母畜偵測到穩定發情時實施一次的人工授精。而在非繁殖季節中，主要利用陰道海綿（含 45mg 之 FGA）、ECG 及 Cloprostenol 等內泌素處理，並於陰道海綿移除後 43 小時實施一次的人工授精。在

比較不同陰道海綿留置時間與 Cloprostenol 施打與否,結果顯示陰道海綿留置 17-21 天,並於陰道海綿移除前 2 天施打 ECG 者,其受精率約為 56.7%,而陰道海綿留置 11 天,並於陰道海綿移除前 2 天施打 ECG 及 Cloprostenol 者,其受精率約為 61.1%。在目前法國山羊人工授精效益上,有 95% 發情率、90% 排卵率、75% 懷孕率與 65% 產仔率。在未來,其將持續進行下列改進與發展:山羊精液生產及儲存技術發展方面,降低單位授精之精子數目、增加冷凍能力與新鮮精液儲存。刺激排卵技術方面,則朝向非荷爾蒙處理方式研究。此外則是年輕女羊人工授精之研究。

三、8 月 5 日亦由 CAPRI-IA 機構之負責人 Mr. Pascal Boue 介紹母羊發情同期化處理方式之原理與目前進展。在乳羊荷爾蒙處理原則為第 0 天將 CIDR 置入欲試驗之母羊陰道內,於第 9 天施打 PMSG 與 PG 後,於第 11 天將 CIDR 移除及於第 13 天實施 1 次人工授精。在其過去研究顯示,CIDR 置入母羊陰道內之時間,以 11 天較 21 天有著高的發情率、排卵率與受精率,在產仔率方面兩者分別為 61% 及 57% ( $P < 0.01$ )。而 PG 施打劑量以 50ug 有著最佳之效果。在 PMSG 施打劑量方面,其重要性為增加母羊群誘發發情之百分比(由 53% 提昇至 100%)以及有助於發情與排卵之時間。經產母羊為 400-600 IU,而女羊則為 250-300 IU 最佳。在其施打時間點方面,於 CIDR 移除前 48 小時施打優於 CIDR 移除時施打者。在併用 P4、PMSG 與 PG 方法上,約有 80% 之母羊於 CIDR 移除後 30 小時內產生穩定發情之現象,而這些羊接受人工授精後其受胎率高於(65% vs 33%)CIDR 移除後 30 小時後才產生穩定發情之母羊。此外,當 CIDR 移除後 30 小時後才產生穩定發情之母羊,若將授精時間延長 10 小時將有助於受胎率之提昇。此外在荷爾蒙處理後併用公羊效應法則有助於穩定發情現象之提前與提昇。

四、8 月 6 日至 8 月 8 日則是跟隨著資深山羊人工授精技術員 Mr. M. Freleteau 至距離 Poitiers 市約 120km 之 3 場羊農飼養戶(圖 5-10)進行山羊人工授精實際操作。



圖 5.第一戶乳羊場外觀。



圖 6.乳羊場榨乳設備。



圖 7.第二戶乳羊場外觀。



圖 8.乳羊場母羊群。



圖 9.第三戶乳羊場外觀。



圖 10.乳羊場母羊群。

Mr. M. Freleteau 為山羊人工授精小組之 leader，負責安排各個羊農飼養戶人工授精的時程、聯絡其他區域性人工授精技術員相互支援及人工授精資料傳輸等相關事宜。到達羊場後，先將所有精液採集、檢查與稀釋等相關設備（圖 11）準備完畢，由羊場畜主將種公羊牽入採精處進行新鮮精液採集，隨即置入 37 溫水中，以微量

吸注器取適量原液置於載玻片上於顯微鏡下觀察精液活力與存活率。另取 10 $\mu$ l 原液置入含 990 $\mu$ l 生理鹽水溶液之石英管中，混勻後置於分光光度計中進行濃度之判讀，最後以脫脂乳粉溶液將精液原液稀釋為 5 億/ml 之終濃度後，進行 0.2ml 麥管裝填並置於 35 $^{\circ}$  溫水中。人工授精操作時先由兩名現場人員分別站於由頸夾固定母羊之兩側，分別同時將其後肢抬起使成倒立狀，由人工授精技術員利用開腔器將母羊之陰道張開觀察子宮頸口所在位置後舉起人工授精槍對準子宮頸口處並確認後將精液注入。完畢後兩名現場人員緩慢將母羊後軀放下，完成人工授精程序。在所有羊隻操作完畢後，Mr. M. Freleteau 取出其電腦，連線至資料庫中心將所有實施人工授精母羊編號及其他相關資料輸入資料庫中儲存(圖 12)，並立即列印出畜主應支付之該次人工授精所需費用。

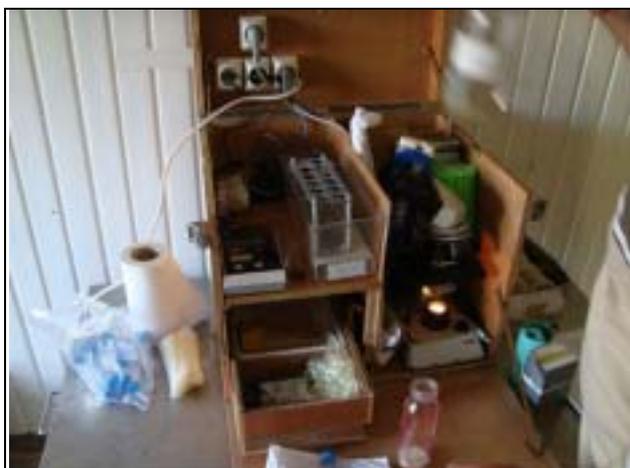


圖 11. Mr. M. Freleteau 之精液鏡檢與稀釋設備。



圖 12. 山羊人工授精後之資料立即傳輸工作。



圖 13. 與農場畜主之合照。



圖 14. 與山羊人工授精小組成員之合照。右 2 為 Mr. M. Freleteau，右 1 及左 1 為人工授精技術員。

此外，在這 3 天之中本人亦在人工授精技術員指導下，分別進行實際之操作（圖 15）。首先將置於 37 溫水中之精液麥管裝填至授精槍內後，緩慢將開腔器插入母畜陰道內並張開，迅速找出子宮頸口後，將授精槍對準之並稍作確認子宮頸口位置，旋即將精液推出，完畢後緩慢拔出開腔器。在人工授精操作方面，現場強調勿強行穿過子宮頸，避免操作過程中使母羊過度緊迫而降低受胎率。



圖 15.王助理研究員實際操作山羊人工授精技術。

五、8 月 11 日前往法國 Poitiers 市郊區之法國國家農業研究院（INRA）分所中的山羊生殖中心（圖 16）拜訪 Dr. Bernard Leboeuf，並與其進行山羊人工授精技術之經驗交流。該生殖中心主要為進行山羊人工授精相關技術之研發與改進，包括母羊發情同期化技術、精液儲存技術及人工授精操作技術等。Dr. Bernard Leboeuf 為該中心之負責人，在山羊人工生殖技術方面擁有多數之實務經驗。因此在本次出國研習的機會，希望能夠借助其專長給與目前國內施行山羊人工授精時所遭遇之問題給與專業建議。

在本次訪談過程中，Dr. Bernard Leboeuf 首先針對目前國內山羊產業作一簡單瞭解後，由王助理研究員針對目前國內施行山羊人工授精之程序與步驟一一說明，包含母羊之挑選、CIDR 放置時間、內泌素施打時間與劑量、發情觀察實施時間與方式以及人工授精操作時間與方式等。Dr. Bernard Leboeuf 在聽取完畢後，首先針對所有相關技術之實施時間點作一確認，認為在時程安排上均與法方相同。其次

Dr. Bernard Leboeuf 便於作法方面給與幾點建議：其一為在操作山羊人工授精時，當開膾器穿入母畜之陰道內至開膾器自母畜之陰道拔除的間隔時間應越短越好，依其所作之實驗結果顯示，開膾器於陰道內停留時間若以 30 及 45 秒作比較，其受胎率可相差到 10-15 %。應是儘可能縮短人工授精操作時間將可避免母畜過度緊迫而提昇母畜受胎率。其次一點為人工授精操作時間點與母畜自身 LH surge 時間點有密切關係，雖然吾等於實施人工授精操作時間點是與法方相同，但仍建議在國內進行簡單的 LH surge 時間點偵測，將有助於瞭解國內羊群其內泌素分泌狀態，進而確認人工授精操作時間點是否需要加以調整。



圖 16. INRA Poitiers 分所中的山羊生殖中心外觀。

六、8 月 12 日前往法國 Tours 市郊區之法國國家農業研究院 (INRA) 分所中的家畜繁殖生理中心 (圖 17、18) 拜訪。該中心主要的研究方向為家畜 (豬、牛、山羊、綿羊) 與野生動物 (鹿) 人工生殖技術之研究，包括母畜發情同期化、腹腔鏡取卵、超量排卵、胚生產與冷凍以及體外胚生產系統 (卵母細胞體外成熟、體外授精與體外培養) 等。Dr. Pascal Mermillod 為該中心之副所長，亦與本分所有多次技術交流之經驗，因此本次行程中特別情商其能安排一日之參訪。

當天早上由 Dr. Yann Locatelli 至本人所下榻之旅館並接送前往該中心。Dr. Yann Locatelli 為該中心之助理教授，主要是反芻動物人工生殖技術方面之專家，過去很長一段時間亦從事與山羊生殖生理相關方面之研究。於抵達該中心後，首先在 Dr. Yann Locatelli 帶領下參觀了該中心的各個實驗室，包含卵母細胞、分子遺傳

及分子演化等。並簡短參觀了該中心之獸醫研究部門，該部門主要為配合各實驗室進行試驗時，協助樣品或試驗材料之取得，因此在研究上其分工是非常明確與仔細。此外因本分所黃分所長政齊曾於 93 年自費前往該中心研習山羊體外胚生產系統相關之技術，並於返國後於恆春分所建立相關之技術平台，目前已建立穩定之培養體系，並已獲得相當於法國之囊胚產出率。惟不管在法國或國內目前均面臨相同之問題，亦即所生產之囊胚品質仍較低劣，仍需要進一步之研究改進。因此於當日下午在 Dr. Yann Locatelli 安排下，與 Mis. Babara 進行訪談。Mis. Babara 為 Dr. Yann Locatelli 與 Dr. Pascal Mermillod 所共同指導之博士班研究生，其主要研究方向為乳牛與山羊之體外胚生產系統。在訪談過程中，除針對在過去數年來本分所將此技術帶回國內後，於分所內實施之情形與結果作一介紹外，亦針對未來研究改進之方向作一簡短介紹。Mis. Babara 目前則是利用輸卵管上皮細胞共培養方式與 SOF 低氧系統作體外生產囊胚品質之比較，未來則期望探知影響囊胚品質之訊息傳導路徑與基因表現態樣等之差異。



圖 17. INRA Tours 分所中的家畜生殖中心外觀。



圖 18. 家畜生殖中心內之胚胎操作與培養實驗室。

## 參、心得

法國不僅為全世界羊乳生產大國之一，且其所擁有完備之乳羊性能育種改良架構及世界上獨一無二種公羊性能檢定與冷凍精液生產中心，為其乳羊產業能夠傲視全球的核心價值之所在，在許多方面是值得吾等多所借鏡之處。在此次研習過程中，除了充份瞭解到其在相關人工生殖技術方面研發的演進與成效外，透過參與其人工授精團體之運作，實際至民間農場進行山羊人工授精技術，使本人對於該技術於田間實作的過程能與其授課過程作一對照，亦使本人於期間能掌握實際操作時之竅門，以期未來於國內推展該技術時在操作方面能多所改進。此外，在短暫訪問法國國家農業研究院之 Tours 分所中的家畜生殖中心後，在山羊人工生殖技術方面，則有助於互相瞭解目前研究重點與未來動態，進一步於未來規劃國際合作之方向與模式。

最後，本次研習過程非常感謝數位法方人員在各項行程上的細心安排，得以讓本人能順利成行。Dr. Jean-Paul Poivey 在行前非常積極且細心的依本人之需求，耐心的與各單位聯繫並接洽；Mr. Pascal Boue 在訓練過程中，適當的課程安排與詳細的解說；Dr. Bernard Leboeuf 及 Dr. Yann Locatelli 非常熱情的於百忙之中撥冗與本人訪談，並不吝分享其豐富之經驗且給予專業建議。

## 肆、建議

- 一、在人工授精實施時機方面，應於母羊發情同期化步驟中 CIDR 移除後 30 小時內分時段進行發情觀察。在此期間內母羊若有穩定發情之徵候，則該母羊應於 CIDR 移除後 43 小時進行人工授精，超過此時期尚未有穩定發情徵候者，則放入公羊進行自然配種，勿再實施人工授精。
- 二、在人工授精前母羊固定操作方面，於母羊進行頸部固定後尾部提起時，羊體應該與地面越接進垂直角度越佳，以利精液注入後易於進入子宮內，且兩後腿應左右平衡，勿歪向任何一邊，以防止流入之精液偏流至一邊子宮角內降低母羊受胎率。
- 三、在人工授精操作方面，切勿強行穿過子宮頸，避免操作過程中使母羊過度緊迫而降低受胎率。
- 四、在整體母羊發情同期化步驟方面，經與法方人員討論後，均認為時程上並無不妥。因此建議於 CIDR 移除後分時段進行採血後測定血中出現 LH 潮湧之時間。以判斷人工授精實施時機是否恰當。

## 伍、相關附錄

### 附錄一、參考文獻

- Baril, G., B. Leboeuf and J. Saumande. 1993. Synchronization of estrus in goats. The relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology* 40:621~628.
- Bearden, H. J. and J. W. Fuquay. 1992. *Applied Animal Reproduction*. Third ed. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, U.S.A. pp.202~203.
- Buckrell, B. C., C. Buschbeck, C J. Gartley, T. Kroetsch, W. McCutcheon, J. M, W. K. Penner and J. S. Walton. 1994. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology* 42:601~611.
- Evans, G. and W. M. C. Maxwell. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Butterworths, Boston, U.S.A. pp. 55~164.
- Fukui, Y., H. Hirai, K. Honda and K. Hayashi. 1993. Lambing rates by fixed time intrauterine insemination with frozen semen in seasonally anestrous treated with a progestagen-impregnated sponge or CIDR device. *J. Reprod. Dev.* 39:1~5.
- Haenlein, G. F. W., R. Caccese and M. C. Smith. 1992. All about AI. In: *Goat handbook*. United State.
- Halbert, G. W., H. Dobson, J. S. Walton and B. C. Buckrell. 1990. The structure of the cervical canal of ewe. *Theriogenology* 33:977~992.
- Garner, D. L. 1991. Artificial insemination. In: P. T. Cupps ed. *Reproduction in Domestic Animals*. Fourth edition, Academic Press, Inc. New York, U.S.A. pp.251~278.
- Windsor, D. P., A. Z. Szell, C. Buschbeck, A. Y. Edward, J. T. B. Milton and B. C. Buckrell. 1994. Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen thawed semen. *Theriogenology* 42:147~157.