



不同类型稀释液对驴冷冻精液品质的影响

冯世武, 张宝良, 马 强

(甘肃省家畜繁育改良管理站, 甘肃 武威 733000)

摘 要: [目的]: 对比分析各类型稀释液对驴冷冻精子活力、畸形率的影响, 根据冻精解冻效果, 筛选出适合驴精子冷冻的最佳稀释液, 最适宜稀释比例, 为驴冷冻精液研发提供参考。[方法]: 实验共计 14 d, 采集 6 头种公驴精液, 每份原精均分为 3 等份, 分别用 3 种稀释液稀释, 从而选取最优稀释液; 按 1:0.75、1:1.5、1:3、1:6 不同比例混合最优稀释液与蒸馏水, 每份原精均分为 4 等份, 对应不同浓度稀释液分别进行稀释、封装、冷冻, 检测冻精子活力和畸形率。[结果]: 普蒂迪尔公牛稀释液、特里拉迪尔公猪稀释液、仙女座马稀释液三种稀释液中, 特里拉迪尔公猪稀释液在配伍比例(稀释液与蒸馏水比值)为 1:3 时, 冷冻过程中能明显降低驴精子的畸形率, 提升精子活力, 能最大限度保存驴精子生殖功能。

关键词: 种公驴; 精子质量; 精液冷冻; 稀释液

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2021)03-0082-03

引言

1951 年以来冷冻精液技术大量用于生产实践, 本世纪随着居民生活水平的提升, 毛驴的营养价值、药理作用逐渐被发掘出来^[1]。相比其它肉类产品拥有较高的脂肪酸、氨基酸、矿物质, 而热量、脂肪和胆固醇低。驴皮是制备名贵中药阿胶原原料, 孕驴血清中促性腺激素制做的绒毛膜促性腺激素成品药剂可治疗不孕不育。驴奶与人奶成分及其相似, 增加免疫力的同时抗氧化, 保持器官活力。甘肃是重度贫困地区, 脱贫方式单一, 结合近年来兴起的毛驴养殖, 探索出一条“养驴致富”的脱贫攻坚之路由为必要。立足甘肃省家畜繁育改良管理站长期从事冷冻精液生产、推广良种冻精的优势条件; 结合甘肃基本省情, 研发驴冷冻精液制作, 推进全省养驴农户地方品种改良、增加农户经济效益、加快畜牧业发展, 实现脱贫致富。

1 材料与方法

1.1 实验动物

1.1.1 种公驴饲养管理 优秀的种公驴是驴冷冻精液制作的前提, 全省范围内收购被毛光滑漆黑、活动性强、食欲饮水良好、四肢健全、肌肉丰满的公驴,

饲养于甘肃省家畜繁育改良管理站养殖基地。依据《不同阶段驴的饲养管理标准》中成年种公驴标准: 日粮按粗蛋白 18% ~ 20%, 粗纤维 0% ~ 4%, 钙 0.8% ~ 1.8%, 磷 0.5% ~ 1.0%; 干草为体重 1%, 精料 0.5%。早中晚定时、定人、定量先精后粗投喂; 投喂量随季节、温度、体重的变化及时调整^[2]; 寒冷冬季提高能量饲料占比, 炎热夏季降低能量以及蛋白饲料占比; 采精前 2 h 内不喂草, 每顿更换不同草料(苜蓿、燕麦、羊草); 自由饮水, 冬季气温 0 ℃ 以下时水槽安装加热装置, 饮水槽水温 10 ℃ 以上, 每日按时清洁水槽; 每头种公驴每日运动至少 1 h, 保证驴床舒适干燥, 夏季铺胶垫, 冬季铺褥草; 驴舍周围环境定时消毒, 及时治疗种公驴疾病; 12 - 24 月龄种公驴每年一次修蹄, 24 月龄以上种公驴每年两次修蹄。

1.1.2 种公驴纳入标准 公驴体重 400 kg 以上, 10 月龄以上, 睾丸发育良好, 附睾明显, 性欲旺盛, 可正常下鞭, 完成射精的公驴, 并抽取 8 μL 原精至于 400 倍显微镜下, ①精子密度 $\geq 20 \times 10^6 / \text{mL}$; ②精子活力 $\geq 65\%$; ③存活率 $\geq 70\%$ 。同时满足上述三种指标确定为合格种公驴, 纳入采精对象。

1.1.3 种公驴排除标准 属于先天生殖器官畸形公驴, 如睾丸萎缩、隐睾等; 年龄小于 2 岁或大于 10

收稿日期: 2021-04-12 修回日期: 2021-04-24

作者简介: 冯世武(1989—), 男, 博士, 兽医师, 主要从事家畜繁殖推广工作。

岁;患有传染病引起的公驴繁殖障碍者,如布鲁氏菌等^[3];公驴从未爬跨,不能采精,且难以调教者。

1.1.4 公驴采精 驴为季节性发情,3月上旬至入冬,4、5、6月份为发情旺季,发情周期1周左右。本实验选取4月份前两周母驴发情最明显时期,以发情母驴为胎驴,诱导公驴爬跨射精。采精员先让公驴空爬一次,等待种公驴性欲旺盛,阴茎下漏坚挺,种公驴前肢爬上母驴时,迅速靠近种公驴左手拖住公驴阴阴茎,右手拿假阴道与公驴成40~60度角,双手配合将公驴阴茎引入假阴道口内,等待公驴完成射精,公驴缓慢趴下,采精员右手紧握假阴道,待公驴四肢着地时取下假阴道远离公驴,并打开活塞放气以便精液快速流入集精杯,快速送入实验室,更换假阴道采集下一头种公驴精液。

1.1.5 临床指标观察 采精前对所有试验对象进行体温和体重的测量,观察并记录其精神状态,采食量,饮水量,体毛光泽度和是否有自淫,血精,采精液结晶等现象。

1.1.6 仪器 载玻片、盖玻片、温度计、500 mL烧杯、200 mL量筒、500 mL容量瓶、移液器枪、假阴道、集精杯、凡士林、恒温水浴箱、精液性状板、细管专用剪、吸水纸、电子分析天平等由甘肃省家畜繁育改良管理站实验室提供;相差显微镜、电视显微录像系统、载物台恒温装置、精子密度测定仪、细管精液分装机、精液冷冻程控仪、液氮罐、低温平衡柜购于德国Minitu公司。

1.1.7 试剂 I组普蒂迪尔公牛稀释液(购自法国CRYO-VET)、II组特里拉迪尔公猪稀释液(购自法国CRYO-VET)、III组仙女座马稀释液(购自德国Minitu公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 驴精液分离 将采集的驴精液用四层医用纱布过滤,1:1加入离心保护液,装入在250 mL无菌塑料离心瓶中,1 850 r/min离心9 min分离精清。用移液枪吸取精清并废弃,最后2~3 mL精清抽打数次与精子混均,一并吸出置锥形瓶内。

1.2.2 精子质量实验室检查 将离心后的精液抽取5 μ L至于显微镜38 $^{\circ}$ C载物台检测活力(活力 $\geq$ 65%);称重后用密度仪测量精液密度、稀释量、细管印刷量;稀释后分装,4 $^{\circ}$ C平衡4 h;放入程控仪冷冻,随机抽取3支置于38 $^{\circ}$ C温水解冻,并检测活力。

1.2.3 各类稀释液抗冻性对比 挑选6头离心后活力为(7.0 $\pm$ 0.50)%的种公驴精液,测量精液密度、稀释量、细管印刷量后,每头驴原精均分为3等份,分别用普蒂迪尔公牛稀释液、特里拉迪尔公猪稀释液、仙女座马稀释液三种稀释液稀释(稀释液与

蒸馏水配伍比例为常用比例1:1:5),置于同等条件下封装、平衡和冷冻,并解冻测活力。

1.2.4 稀释液配比浓度对比 将1.2.3中抗冻效果最好稀释液,按1:0.75、1:1.5、1:3、1:6不同比例分别配制。挑选6头离心后活力为(7.0 $\pm$ 0.50)%的种公驴精液,均分为4等份,分别用上述比例稀释液稀释,同等条件下封装、平衡和冷冻,并解冻测活力。

1.2.5 数据分析 将记录的数据录入Excel 2010制成电子表格,录完入后再由他人核查数据,保证数据的高度精确。导入SPSS 21.0对数据资料经计算双侧t检验S-N-K输出,试验数据用“平均值 $\pm$ 标准差”表示。本文表格中数据为每种稀释液中6头精液活力计算平均值所得,不同稀释液配比浓度同样只计算平均值。

2 结果

2.1 一般临床症状观察

种公驴在采精期间未见明显病症,采精前后体重为(409.29 $\pm$ 41.21) kg、(411.68 $\pm$ 36.43) kg, P=0.536>0.05;采精前后体温为(37.4 $\pm$ 1.21) $^{\circ}$ C、(37.3 $\pm$ 1.29) $^{\circ}$ C, P=0.378>0.05,体温、体重差异均不显著,说明采精不会对实验动物造成影响。

2.2 各类稀释液冻精解冻活力比较

将3种稀释液稀释冷冻6头种公驴原精,解冻后精子活力双侧t检验S-N-K法输出,由表1看出,组II与组I、组III相比精子活力明显偏高(P<0.01),说明组II稀释液抗冻性明显优于I组、III组;组II与组I、组III相比精子畸形率显著降低(P<0.05),说明组II稀释液在冷冻过程中对精子生理结构的保护作用强于I组、III组。

表1 各组精液平均指标比较

稀释液 组别	稀释液类型		
	I组	II组	III组
精子活力/%	11 $\pm$ 3.8	35 $\pm$ 4.2**	15 $\pm$ 3.9
畸形率/%	51.23 $\pm$ 10.47	20.15 $\pm$ 8.99*	56.15 $\pm$ 9.98

注:与其它组比较,*P<0.05,**P<0.01。

2.3 配比浓度冻精解冻活力比较

表2,组1:3与其它3组对比精子活力明显提高(P<0.01),说明II组稀释液在配伍比例为1:3时最适合冻精复苏,能最大限度保存精子生殖功能;组1:1.5、组1:3与其它II组对比精子畸形率显著降低(P<0.05),但组1:1.5、组1:3精子畸形率差异不明显,说明II组稀释液在配伍比例为1:3与1:1.5都能最大限度保护精子生理结构,降低畸形精子的发生率。

表 2 各组精液平均指标比较

稀释液浓度	稀释液在配伍比例			
	1:0.75	1:1.5	1:3	1:6
精子活力/%	19±4.0	35±4.2*	51±3.7**	18±3.8
畸形率/%	46.21±	20.15±	21.15±	44.86±
	10.31	8.99*	9.34*	10.18

注:与其它组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

3.1 驴冷冻精液制作

精液由精子和精液分两部分,其体积取决于副性腺分泌的精清^[4]。公畜副性腺由精囊腺、前列腺、尿道球腺组成,驴是马属动物副性腺发达射精液量较多(>100 mL),但精子密度小不能直接稀释冷冻,必须将精子、精清分离。将采集的驴精液 1 850 r/min 离心 9min 分离精清^[5-9]。离心后加入稀释液方可冷冻,目前没有国际、国内标准,参照《牛冷冻精液生产技术规程》标准号:NY/T 1234-2018 开展驴冷冻精液研发工作,活力检测、精液封装、平衡冷冻以牛冷冻精液制作方法为暂时标准。

3.2 驴稀释液配方

冷冻精液稀释液配方多种多样,目前市场并无成品驴专用稀释液,结合已有的稀释液找出适合驴稀释液配方。邓双义研究表明丙三醇(俗称甘油)保护精子细胞膜的结构和通透性,降低精子的畸形率^[10]。稀释液中加入的甘油比例不同导致精子畸形发生率不同,但甘油浓度超过 4% 增大了稀释液渗透压,精细胞脱水破坏细胞结构。甘油一定程度上保护了精子细胞膜完整性。

4 结论

对比普蒂迪尔公牛稀释液、特里拉迪尔公猪稀释液、仙女座马稀释液 3 种稀释液冻精解冻活力发现,特里拉迪尔公猪稀释液在冷冻过程中能明显降低驴精子的畸形率,提升精子活力;对比特里拉迪尔公猪稀释液不同配比浓度结果表明,该稀释液在配伍比例(稀释液与蒸馏水比值)为 1:3 时最适合冻精复苏,能最大限度保存精子生殖功能,因此特里拉迪尔公猪稀释液更适合于公驴精子冷冻过程。

参考文献:

- [1] 项纯龙. 貉精液品质的检测[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2007.
- [2] 杨永毅. 精索静脉曲张显微手术的临床疗效及对精液微生态的影响[D]. 杭州:浙江大学, 2017.
- [3] 黄学宏. 显微镜精索结扎术与腹腔镜高位精索结扎术对精液质量的疗效对比研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学, 2015.
- [4] 曹江丽. 以 DMA 为冷冻保护剂的鸡精液颗粒与细管冷冻技术的研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2017.
- [5] 刘玉. 猪常温精液稀释液配方的筛选与优化[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2013.
- [6] 卫帅毅. 猪精液常温保存稀释液保存效果研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2016.
- [7] 侯丽鹏. 不同稀释液对猪精液常温保存效果的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2012.
- [8] 李晟. 猪精液冷冻保存技术方法的研究[D]. 长沙:湖南农业大学, 2013.
- [9] 胡传水. 猪精液常温稀释液中添加褪黑素、盐酸多巴胺、卵黄对精液保存效果的影响[D]. 南宁:广西大学, 2013.
- [10] 比安哲. 萨能奶山羊精液的品质检测及低温液态保存效果的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2016.

Effect of Different Diluents on Quality of Frozen Donkey Semen

FENG Shi-wu, ZHANG Bao-liang, MA Qiang

(Gansu Livestock Breeding and Improvement Management Station, Wuwei, Gansu 733000, China)

Abstract: Objective: To compare and analyze the effects of various diluents on the motility and malformation rate of frozen donkey sperm. According to the thawing effect of frozen sperm, the optimum diluent and dilution ratio suitable for frozen donkey sperm was selected, which would provide reference for the research and development of frozen donkey sperm. Methods: Six kinds of male donkey semen were collected for 14 days in total. The semen was divided into 3 equal portions and diluted with 3 kinds of diluents respectively in order to select the optimum diluent. It was prepared by mixing distilled water with 1:0.75, 1:1.5, 1:3 and 1:6 in different proportions. Each original sperm was divided into 4 equal parts, corresponding to dilution, packaging and freezing with different concentrations of diluent, and the frozen sperm motility and malformation rate were detected. Results: Among the three diluents of Terry Deere boar diluent, Andromeda horse diluent in three kinds of diluents, Terry Deere boar diluent in compatibility proportion (ratio of dilution with distilled water) of 1:3 could obviously decrease the donkey sperm deformity rate, improve sperm vitality, and could maximize the preservation of donkey sperm reproductive function during the freezing process.

Key words: breeding male donkey; sperm quality; semen freezing; diluent