

牛冷冻精液不同有效精子数输精效果的研究

朱新培¹, 高玉琮¹, 王丽瑄¹, 赵应忠², 赵朝²,

赵其毅³, 李春平¹, 李雯¹, 赵家才^{1*}

(1. 云南农业职业技术学院, 昆明 650212; 2. 施甸县畜牧兽医服务中心, 施甸 678200;

3. 龙陵县畜牧兽医服务中心, 龙陵 678300)

摘要: [目的] 肉牛种业为肉牛生产发展的基础和前提, 种公牛是肉牛业发展的“芯片”, 直接关系到生产的质量和效率。为提高优秀种公牛的利用率和区域覆盖率, 适当降低每剂冷冻精液的有效精子数量, 同时能够确保其输精受孕率不受影响而进行该研究。 [方法] 制作含有效精子数分别为 8×10^6 、 4×10^6 、 2×10^6 , 三组牛冷冻精液, 用上述冷冻精液进行输精试验, 比较输精效果。 [结果] 有效精子数为 8×10^6 、有效精子数为 4×10^6 、有效精子数为 2×10^6 , 三个试验组间其人工输精后受孕率进行了比较。研究结果表明, 输精总受孕率差异不显著, 降低有效精子数, 其输精受孕率未受影响。 [结论] 降低每剂冷冻精液的有效精子数量 ($2 \sim 8 \times 10^6$) 在适当范围内, 其输精受孕率差异不显著。

关键词: 种公牛; 冷冻精液; 有效精子数; 输精; 受孕率

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2023)06-0030-04

牛冷冻精液技术是发展养牛业的重要手段, 受到世界各国的高度重视, 应用十分广泛, 技术迭代加快。牛冷冻精液技术发展应用日臻成熟, 但进一步的研究仍十分重要。人工授精技术不仅可有效改变家畜的交配过程, 更重要的是其可充分发挥优良种公畜的种用价值和配种效能, 加速品种改良, 促进育种工作。同时还可减少疾病的发生和传播、扩展优良种畜配种地区和范围。不同发达国家牛冷冻精液国家标准差别较大。我国进口的冻精大部分采用的 300 ~ 500 万前进运动精子数, 发达国家种公牛每年冻精平均单产量是国内的 2 ~ 6 倍, 而国内牛冷冻精液标准有效精子数偏高是主要原因之一; 荷斯坦公牛当每剂量前进运动精子数降低到 2×10^6 时, 不影响其人工输精后的情期受孕率^[1]。适当减少肉用西门塔尔种公牛冷冻精液有效精子数含量具有重要意义和应用价值。

1 材料和方法

1.1 种公牛的来源和质量标准

严格按《中华人民共和国畜牧法》和《中华人民共和国动物防疫法》的要求依法引进饲养和防疫。供试验的种公牛为云南省种畜繁育推广中心冷冻精液站饲养的西门塔尔牛, 编号为 XM53115334、XM53119375。^[2-4]

1.2 种公牛的饲养管理

种公牛饲养方式为单圈饲养, 定时定量饲喂, 自由饮水, 舍内自由运动, 运动场面积 60 m², 保持牛舍和运动场清洁干燥舒适, 加强种公牛日常保健和肢蹄的护理。日粮结构为: 混合精料青年公牛 3 ~ 4 kg, 成年公牛 5 ~ 6 kg, 苜蓿 2 kg, 燕麦干草 8.0 ~ 10.0 kg, 混合精料配方: 玉米 45 %、麦麸 30 %、豆粕 20%、食盐 1 %、微量元素补充料 4 %。按免疫程序免疫接种、驱虫和环境消毒。保持种公牛生理状态良好。

1.3 公牛的采精方法

公牛用假阴道法采精^[2], 采精前用消毒液清洗公牛包皮, 药物浓度不能太高, 药用量太大药物会进

收稿日期: 2023-10-01 修回日期: 2023-10-10

基金项目: 云南农业职业技术学院科研重点项目 (Ynavc202213)

作者简介: 朱新培 (1977—), 女, 高级畜牧师, 主要从事教学和家畜繁殖技术研究。

* 通讯作者: 赵家才 (1965—), 男, 高级畜牧师, 主要从事家畜冷冻精液技术研究、质量管理和良种推广。

入精液。每天采精前将公牛牵到采精棚停留 15 ~ 20 min,使其产生生理刺激,时间低于 15 或高于 30 min 精液产量便会下降,采精前让公牛空爬 2 次,等待 5 min,再空爬 2 ~ 3 次,爬跨时防止阴茎触及台牛,当种公牛性兴奋充分,阴茎勃起爬跨台牛时把阴茎导向假阴道外口插入假阴道,公牛即可射精。假阴道采精内胎温度为 40℃ ~ 45℃,压力和润滑度适宜。采精时采精员要注意人畜安全、沉着冷静、胆大心细、操作熟练、自然,避免不良刺激造成公牛不快,防止形成恶癖,不利于正常采精,公牛射精后移开假阴道收集精液送入实验室处理。

1.4 公牛精液品质的检测方法和指标

种公牛精液品质的检测执行国家牛冷冻精液标准(GB4143-2008)及生产技术规程进行,测定公牛的射精量、用相差显微镜测精子活力、用分光光度计测定精子密度。

1.5 种公牛冷冻精液的制作

种公牛原精液活力 65% 以上、精子密度为 6.0 亿/mL 以上,无其他异常即可用于生产冷冻精液,取同一头公牛精液按有效精子数 2×10^6 、 4×10^6 和 8×10^6 的要求分为三份,分别加入所需的冷冻稀释液融合混匀,稀释后的精液用 MRS 一体机分别罐装、封口、标记,水平放于冷冻架上,然后放入 4℃ 的冰箱中平衡 2 ~ 4 h,平衡后的细管精液用程控冷冻仪冷冻,冷冻曲线为:程控仪箱内温度由室温以 5℃/min 的速度降温至 4℃,保持 120 s,放入精液后在 4℃ 下保持 30 s,从 4℃ 以 5℃/min 的速度降温至 -10℃,从 -10℃ 以 40℃/min 的速度降温至 -100℃,从 -100℃ 以 20℃/min 的速度降温至 -140℃,最后把冻后的冻精浸入液氮中,再随机抽样解冻,解冻温度为 35 ± 2 ℃。

稀释液用量及每剂量有效精子数控制如公式 A、B、C

A 试验组:

$$\frac{800 \text{ 万有效精子数}}{\text{所需稀释液量}} = \frac{\text{原精液量} \times \text{精子密度} \times 0.40 \times 0.20}{0.08} - \text{原精液量}$$

B 试验组:

$$\frac{400 \text{ 万有效精子数}}{\text{所需稀释液量}} = \frac{\text{原精液量} \times \text{精子密度} \times 0.40 \times 0.20}{0.04} - \text{原精液量}$$

C 试验组:

$$\frac{200 \text{ 万有效精子数}}{\text{所需稀释液量}} = \frac{\text{原精液量} \times \text{精子密度} \times 0.40 \times 0.20}{0.02} - \text{原精液量}$$

检测解冻活力 ≥ 0.40 ,有效精子数符合 2×10^6 、 4×10^6 和 8×10^6 的冻精方可保存和用于输精试验。

1.6 输精试验地点

输精试验点为保山市隆阳区、施甸县元何乡和龙陵县腊勐镇冻改点、象达镇大场冻改点、龙山镇冻改点、龙江乡冻改点。

1.7 母牛的来源

输精试验母牛为隆阳区、施甸县何元乡和龙陵县腊勐镇冻改点、象达镇大场冻改点、龙山镇冻改点、龙江乡冻改点当地养殖户饲养自然发情的母牛,试验时间为 2022 年 11 月 ~ 2023 年 6 月。输精方法为直肠把握输精法,输精部位为子宫颈。冻精 37℃ 水浴解冻。每个情期输精一次。妊娠检查采用 0 ~ 90d 不返情和直肠检查。

1.8 数据来源和处理方法

试验数据来源于 2022 年 11 月 ~ 2023 年 7 月各个试验点的母牛配种记录,用生物统计法统计,结果进行方差分析和两个样本百分数差异显著性检验^[5]。

2 结果与分析

2.1 公牛不同有效精子数对输精效果

不同有效精子数对输精效果见表 1。

2.2 不同输精月份的受胎效果

不同月份牛冷冻精液人工输精效果见表 2。

表 1 每剂量中 8×10^6 、 4×10^6 、 2×10^6 有效精子数人工输精效果比较

项目	8×10^6 (A)			4×10^6 (B)			2×10^6 (C)		
	输精数 /头	受胎数 /头	总受胎率 / %	输精数 /头	受胎数 /头	总受胎率 / %	输精数 /头	受胎数 /头	总受胎率 / %
何元乡	37	33	89.19	49	42	85.71	38	36	94.74
腊勐镇	21	18	85.71	33	29	87.88	32	27	84.38
龙江镇	54	49	90.74	13	11	84.62	25	20	80.00
象达镇	25	22	88.00	15	12	80.00	16	10	62.5
龙山镇	21	18	85.71	18	12	66.67	43	36	83.72
隆阳	40	35	87.5	46	38	82.25	27	21	77.78
小计	198	175	88.38	174	144	82.76	181	150	82.87
平均			87.81 ± 1.97			81.19 ± 7.63			80.52 ± 10.58

注:表 1 同行总受胎率间右上标不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),无上标字母标示差异不显著($P > 0.05$)。

表 2 2022 年 11 月 - 2023 年 7 月牛冷冻精液人工输精效果比较

项 目	配种数/头	受胎数/头	总受胎率/ %
2022 年 11 月 - 2023 年 1 月	54	50	92.59 ^{Aa}
2023 年 2 月 - 2023 年 4 月	120	107	89.17 ^{Ba}
2023 年 5 月 - 2023 年 7 月	74	53	71.62 ^A

注:表 2 总受胎率列间右上标不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),不同小写字母标示差异显著($P < 0.05$)相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 不同改良点牛冷冻精液人工输精受胎率比较

表 3 不同改良点输精受胎率比较

有效精子数	何元乡受胎率 / %	腊勐镇受胎率 / %	龙江镇受胎率 / %	象达镇受胎率 / %	龙山镇受胎率 / %	隆阳受胎率 / %
8×10^6	89.19	85.71	90.74	88	85.71	87.5
4×10^6	85.71	82.61	84.62	80	66.67	82.61
2×10^6	94.74	84.38	80.00	62.5	83.72	77.78
平均	89.88	84.23	85.12	76.83	78.70	82.63

注:表 3 同行间右上无标字母标示差异不显著($P > 0.05$)。

2.4 不同输精部位牛冷冻精液受胎率比较

表 4 不同输精部位对母牛受胎率的影响

输精部位	有效精子数	输精头数	返情头数	受孕头数	返情率/ %
右子宫角	8×10^6	24	6	19	25.00 ^{ab}
左子宫角	8×10^6	36	6	30	16.67 ^b
子宫体	8×10^6	22	8	16	36.36 ^a

注:表 4 同列返情率间右上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),上标相同小写字母标示差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论与小结

3.1 我国牛冷冻精液有效精子数不断降低

随着科学研究的深入和新技术推广应用,牛的繁殖技术不断进步和提高,牛冷冻精液标准日益规范完善,GB4143 - 84 于 1984 年 1 月 27 日发布,1984 年 9 月 1 日实施,冻精剂型有安瓿(0.5 mL,有效精子数 $\geq 15 \times 10^6$)、颗粒(0.1 $\pm$ 0.01 mL,有效精子数 $\geq 12 \times 10^6$)和细管(剂量:中型 0.5 mL,微型 0.25 mL;有效精子数 $\geq 10 \times 10^6$;精子畸形率 $\leq 20\%$;顶体完整率 $\geq 40\%$;冻精解冻活力 $\geq 30\%$)。GB4143 - 2008 于 2008 年 6 月 27 日发布,2009 年 1 月 1 日实施,冻精剂型细管(剂量:中型 ≥ 0.4 mL,微型 ≥ 0.18 mL);有效精子数 $\geq 8 \times 10^6$ 万个^[6](水牛 ≥ 1000);精子畸形率 $\leq 18\%$ (水牛 $\leq 20\%$);冻精解冻活力 $\geq 35\%$ (水牛 $\geq 30\%$);GB4143 - 2022 于 2022 年 12 月 29 日发布,2024 年 1 月 1 日实施,奶牛、肉牛有效精子数 $\geq 6 \times 10^6$ ^[1],有效精子数的要求逐渐降低。

3.2 牛冷冻精液受胎率不受有效精子数降低的影响

国际上,20 世纪 50 - 60 年代有效精子数 $30 \sim 50 \times 10^6$,70 - 80 年代有效精子数 $10 \sim 15 \times 10^6$,德国有效精子数 $5 \sim 8 \times 10^6$,法国有效精子数 $3 \sim 8 \times$

10^6 ,澳大利亚有效精子数 $5 \sim 8 \times 10^6$,美国、加拿大有效精子数 $2 \sim 8 \times 10^6$,我国有效精子数 $7 \sim 18 \times 10^6$,有效精子数 $3 \sim 8 \times 10^6$ 受胎率与有效精子数 8×10^6 差异不明显,发达国家牛冷冻精液没有统一国家标准,而是依据不同的种公牛个体情况采取比较灵活的企业标准^[7]。张壮志和张晋(2009)、李连起等(1997)以及朱蕾(2007)等研究均表明,当公牛冷冻精液每剂量中前进运动精子数为 6×10^6 时,人工输精后,情期受胎率不受影响^[1,8-10]。

3.3 有效精子数为 8×10^6 、 4×10^6 、 2×10^6 牛冷冻精液人工输精效果良好

本试验选择在保山市施甸县、龙陵县所属冻精改良点,输精母牛为当地养殖户饲养,地处比较偏僻,部分地方交通不便,受胎率偏低。2.1 表 1 的结果得出,用有效精子数为 8×10^6 、 4×10^6 、 2×10^6 冷冻精液输精,总受胎率分别为 $87.81 \pm 1.97\%$ 、 $81.19 \pm 7.63\%$ 和 $80.52 \pm 10.58\%$,经统计检验分析,总受胎率差异均不显著($P > 0.05$),该结果与王彦平,韩广文,丛慧敏等的研究结果一致^[1],有效精子数为 2×10^6 时对输精受胎率无明显影响。

3.4 不同月份对牛冷冻精液人工输精效果的影响

2022 年 11 月—2023 年 1 月和 2023 年 2 月—2023 年 4 月牛冷冻精液输精受胎率极显著($P < 0.01$)高于 2023 年 5 月—2023 年 7 月输精受胎率,结

果与王彦平,韩广文,丛慧敏等^[1]的研究和游金进和林兆京(2007)等研究表明夏季会明显降低牛冷冻精液受胎率^[11]相一致。

3.5 不同改良点牛冷冻精液输精对受胎率的影响

2.3表3的结果看出,不同改良点输精受胎率的差异均不明显($P > 0.05$)。云南养牛业发展较早,各民族素有养牛的习惯,养牛业畜牧业中占有重要地位,2021年末存栏871.03万头,是活牛输出主产区,成为养殖户增收的主要来源,品种改良得到普遍接受,改良点间的竞争意识加剧,技术进步和服务水平日益提高,牛冷冻精液输精受胎率不断提高,差距日益缩小。

3.6 不同输精部位对母牛受胎率的影响

从表4的结果显示,本试验中,不同输精部位母牛受胎率具有明显差异($P < 0.05$),子宫体输精返情率高于左右子宫角输精,左子宫角输精和右子宫角输精,返情率差异不明显($P > 0.05$),由于试验数量有限,仍需要继续探究。

追求种公牛的高遗传水平和育种收益的最大化,要求繁殖性能持续提高,在完善传统育种技术的同时,挖掘优秀种源生产潜力也是研究的重点内容。优秀种公牛及其精液对提高种畜繁殖力^[12],加速良种选育和扩繁起着重要作用,提高冷冻精液质量和适当降低有效精子数可充分利用良种公牛的遗传性能,增加冷冻精液产量,增强良种供给能力,不受种公牛有限生命的限制,提高优良种公牛利用率,大规模应用冷冻精液人工授精,可以迅速提高生产力,提高遗传进展,用保存的冷冻精液输精产生后代,把最

优秀的遗传物质长期保存,随时为科研、生产使用;不受时间和地域限制,随时提供精液,不受疾病和季节因素影响,可以同时大量和远距离异地输精,避免远距离运输活体,有效防止疫病传播。所以,适当减少种公牛冷冻精液有效精子数含量既不影响输精效果,对育种及品种资源保护均具有重要意义和应用价值。

参考文献:

- [1] 王彦平,韩广文,丛慧敏,等.降低牛细管冷冻精液前进运动精子数对受胎率影响的初步研究[J].中国奶牛,2013(17):45-48.
- [2] 陈伟生.牛冷冻精液生产质量管理手册[M].北京:中国农业出版社,2005.12.
- [3] 刘海良.种公牛培育技术手册[M].中国农业出版社北京2015.10.
- [4] 金德华,罗国章.牛冷冻精液生产与质量管理标准化作业手册[M].南京:江苏凤凰科学技术出版社,2015:7.
- [5] 明道绪.生物统计附实验设计[M].北京:中国农业出版社,2002:6.
- [6] 杨忠华.关于牛冷冻精液有效精子数标准的探讨[J].黑龙江畜牧科技,2007(01):30.
- [7] 张社志,张晋.降低牛细管冷冻精液有效精子数对受胎率影响的试验报告[J].甘肃畜牧兽医,2009,39(03):16-18.
- [8] 李连起,刘士江,孙耀堂,等.奶牛每支冻精500万有效精子数受配准胎的效果研究[J].黑龙江畜牧科技,1997(02):6.
- [9] 朱蕾,刘晓宁,赵一丹等.种公牛低密度精液的冷冻试验[J].黑龙江动物繁殖,2007(4):31-32.
- [10] 游金进,林兆京.降低热应激对奶牛受胎率影响的对比试验[J].畜禽业,2007(10):19-20.
- [11] 王杏龙,毛永江.利用优秀种公牛冷冻精液推进奶牛品种改良[J].上海畜牧兽医通讯,2009(6):98.

Study on the Effect of Sperm Transfusion with Different Effective Sperm Counts in Frozen Semen of Cattle

ZHU Xin-pei¹, GAO Yu-qiong¹, Wang Li-xuan¹, LI Wen¹, ZHAO Ying-zhong², ZHAO Chao²,
ZHAO Qi-yi³, WANG Li-xuan¹, LI Chun-ping¹, ZHAO Jia-cai^{1*}

(1. Yunnan Agricultural Vocational and Technical College, Kunming 650212; 2. Animal husbandry and veterinary service center of Shidian County, shidian 678200; 3. animal husbandry and veterinary service center of Longling County, Longling 678300)

Abstract: [Objective] Beef cattle seed industry is the foundation and premise of beef cattle production and development, and breeding bull is the "chip" of beef cattle industry development, which is directly related to the efficiency and quality of production. In order to improve the utilization rate and coverage of excellent breeding bulls, the effective sperm number per dose of frozen semen was appropriately reduced, and the fertility rate of insemination was not affected. [Method] Three groups of frozen semen containing effective sperm were prepared with 8×10^6 , 4×10^6 and 2×10^6 sperm, and the insemination test was carried out with the frozen semen mentioned above, and the insemination effect was compared. [Result] The fertility rate after artificial insemination was compared between the three experimental groups of 8×10^6 , 4×10^6 and 2×10^6 . The results showed that there was no significant difference in the total fertility rate of the shaft, and the fertility rate of sperm was not affected by the reduction of the effective sperm count. [Result] The effective sperm count per dose of frozen semen ($2 \sim 8 \times 10^6$) was reduced, and the fertilization rate was not significantly different.

Key words: breeding bull; frozen semen; effective sperm count; Insemination; Conception rate