

不同解冻方法对奶牛冻精活力的影响^{*}

卜书海¹, 孙志杰², 李青旺², 于永生², 王立强², 胡建宏²

(1 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 将5头荷斯坦种公牛细管冻精在不同温度、不同时间下进行解冻, 对解冻后的精液品质进行检测。结果表明: 解冻后顶体正常率、精子活率随解冻温度升高而升高, 而畸形率随解冻温度升高而降低($P < 0.01$); 高温(37℃, 75℃)下随着解冻时间延长, 活率增高($P < 0.05$); 低温(5℃)、室温(15℃)下解冻, 活率与解冻时间长短没有明显关系($P > 0.05$); 精子顶体正常率、畸形率、存活时间与解冻时间无显著关系。在实践中建议使用75℃ 2~6 s解冻。

[关键词] 奶牛精液; 解冻温度; 解冻时间; 精液品质

[中图分类号] S823.3⁺4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2002)05-0040-04

牛、羊精液冷冻保存技术研究主要开始于20世纪50年代, Polge等^[1]用甘油作冷冻保护剂, 在-79℃保存牛精液并用于输精, 于1951年产下世界上第一头冷冻精液牛犊。现在养牛业中, 已广泛应用冷冻精液人工授精, 该技术极大地促进了牛生产性能的改进和新品种的培育。目前对牛、羊冷冻精液的研究多集中在冷冻方法上^[2], 对解冻方法研究不多, 而解冻温度和解冻时间对解冻后精液品质也有极大的影响, 同样制约着输精后的受胎率^[3]。本研究通过不同解冻方法对牛细管冻精进行解冻, 目的是寻找最佳解冻温度和解冻时间, 从而提高精子解冻后的活率和受胎率。

1 材料和方法

1.1 冷冻精液样品来源

随机从西安市种公牛站选用5头荷斯坦种公牛, 采精后, 对鲜精进行品质检测, 选择活率达到70%以上, 精子密度在20亿个/mL以上的精液用于冷冻。从选用的每头种公牛的0.25 mL冻精细管中随机选12支用于研究, 共计60支。

1.2 试验设计

试验采用二级系统分组模式设计。解冻温度作为一级因子, 设4个水平, 即5, 15, 37, 75℃。解冻时间作为二级因子设12个处理, 分别为5℃(60, 90, 120 s), 15℃(20, 40, 60 s), 37℃(10, 20, 30 s), 75℃(2, 4, 6 s)。每个处理5个重复。

1.3 精子活率、存活时间的评定及其形态观察

活率及存活时间的评定 按照不同的解冻方法解冻后, 立即取1~2滴精液滴在事先预热的载玻片上, 置于显微镜下37℃恒温载物台上, 测定活率。剩下的精液注入盛有1 mL质量分数2.9%柠檬酸钠溶液的试管中, 放入37℃恒温水箱内孵育记录精子存活时间。开始每隔1 h观测1次活率, 当精子活率降低一半时, 间隔30 min观测1次活率, 直到精子全部死亡, 记录精子存活时间。

精子形态的观察 将解冻后的精液滴于载玻片上, 用姬姆萨染色法染色。每个处理各做2张切片, 在1 000倍油镜下观察精子形态, 顶体损伤主要表现为顶脊边缘不光滑, 肿胀如月牙状突起或向后翻转, 形成皱褶; 顶体内出现空泡, 表面凹凸不平, 顶体破裂, 碎片掉落。畸形主要为头部畸形(长形头、梨形头、巨形头)和尾部畸形(尾部卷曲、弯曲)。每个切片计数200个精子, 计算其顶体正常率和畸形率。

1.4 数据统计

采用二级系统分组资料进行方差分析, 以百分数表示活率, 顶体正常率和畸形率在方差分析前均经反正弦转换。各组均数间用新复极差法进行检验。

2 结果与分析

2.1 精子活率

2.1.1 解冻温度对精子活率的影响 不同解冻温度解冻后精子活率如表1所示。随着解冻温度升

^{*} [收稿日期] 2002-04-05

[基金项目] 陕西省科技攻关项目(4130303)

[作者简介] 卜书海(1974-), 男, 黑龙江佳木斯人, 助教, 主要从事动物保护研究。

高,解冻后精子活率也升高。37 和 75 °C 下冻精解冻后的活率显著高于 5 和 15 °C ($P < 0.05$)。75 °C 解冻后冻精活率最高,达到 41%,5 和 15 °C 解冻后活率差异不显著,均低于 25%。

度下解冻时间长短不同,精子的活率也不同(表 1)。低温、室温(5 和 15 °C)解冻后活率差异不显著($P > 0.05$)。而较高温度(37 和 75 °C)下解冻,不同解冻时间差异显著($P < 0.05$)。

2.1.2 解冻时间对精子活率的影响 同一解冻温

表 1 不同解冻温度与解冻时间对解冻后活率和存活时间的影响

Table 1 The effects of different thawing temperature and thawing time on the proportion of motile spermatozoa and the motile length

温度/°C Temperature	时间/s Time	重复数 Repetition number	活率(X±s)/% Survival rate	存活时间/h Survival time
5	60	5	20.0±2.7 ef	10.71±0.32 b
	90	5	18.0±2.5 ef	10.01±0.24 a
	120	5	21.0±4.0 de	9.52±0.1 a
15	20	5	19.4±4.0 de	11.21±0.37 b
	40	5	24.0±1.9 d	11.42±0.32 b
	60	5	23.0±3.4 d	11.37±0.11 b
37	10	5	31.6±1.6 c	13.42±0.17 c
	20	5	37.0±3.0 b	13.47±0.49 c
	30	5	38.0±3.0 b	13.59±0.38 c
75	2	5	38.0±1.2 b	14.54±0.16 d
	4	5	42.0±1.9 a	15.37±0.51 e
	6	5	43.0±2.0 a	15.78±0.58 e

注: 同列标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: Within same column, different lowercase letter shows significant difference ($P < 0.05$).

2.2 精子顶体正常率与畸形率

解冻温度、时间对精子顶体正常率、畸形率的影响见表 2。在油镜 1 000 倍显微镜下观察精子形态,75 °C 解冻时的顶体正常率(68.14%)显著高于 5, 15, 37 °C 解冻时的顶体正常率($P < 0.05$),而精子畸形率(8.63%)显著低于 5, 15, 37 °C 时解冻的畸形率($P < 0.05$),且后三者之间差异不显著($P > 0.05$)。结果(表 2)还表明,37 °C 10 s, 75 °C 2 s 解冻后,精液的温度达到 5 °C; 37 °C 20 和 30 s, 75 °C 4 和 6 s 相

当于将精液温度升至 35~37 °C。在 5 °C 和室温条件下解冻,精子细胞通过致死温区的时间长,冰晶造成的损伤和溶液效应对膜结构的破坏均较严重。在本试验中,75 °C 解冻精子越过危险温区的速度快,对精子细胞损伤小。同时在较高温度(37 和 75 °C)时,解冻时间间顶体正常率和畸形率差异不显著,低温下,随着解冻时间的延长,畸形率降低,顶体正常率也有上升的趋势,但差异不显著。

表 2 不同解冻时间对顶体正常率和畸形率的影响

Table 2 The effects of different thawing times on the proportion of acrosomal integrity and abnormal spermatozoa rate

温度/°C Temperature	解冻时间/s Thawing time	顶体正常率/% Head normal rate	重复数 Repeated number	显著性检验 Obviously test	畸形率/% Abnormal rate	显著性检验 Obviously test
5	60	42.9±5.73	5	a	27.49±4.9	d
5	90	47.8±1.47	5	be	23.5±3.59	c
5	120	47.24±1.87	5	b	21.47±3.57	bc
15	20	46.26±3.54	5	ab	25.62±0.89	d
15	40	50.94±0.92	5	ce	26.95±6.3	d
15	60	49.9±1.65	5	be	24.20±1.9	c
37	10	50.53±1.845	5	ec	23.76±1.16	c
37	20	49.02±2.06	5	be	23.26±3.13	c
37	30	46.78±1.79	5	b	24.65±3.53	cd
75	2	56.42±4.22	5	d	14.3±1.6	e
75	4	55.61±0.93	5	d	18.34±1.82	ab
75	6	54.82±2.12	5	d	18.29±2.55	ab

注: 表内数据为反正弦转换后数据; 同列标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。
Note: The data are transferred from arcsin data which are gotten from the research, within same column, different lowercase letter shows significant difference ($P < 0.05$).

2.3 精子存活时间

精子的存活时间是影响受胎率的一个重要因素。存活时间随解冻温度升高而延长,比较各组存活时间可以看出: $75^{\circ}\text{C} > 37^{\circ}\text{C} > 15^{\circ}\text{C} > 5^{\circ}\text{C}$ 。由表1可见,除 5°C 解冻 120 s 的存活时间长于 5°C 解冻 60 s、90 s 及 75°C 解冻 6 s 的精子细胞存活时间长于 75°C 解冻 2 s 和 4 s 外,其余各处理之间差异均不显著。

3 讨论

目前,英、法、日、墨西哥、印度等国家采用的低温(5°C)缓慢解冻,新西兰、芬兰、瑞典、澳大利亚使用的室温(15°C)中速解冻,匈牙利、比利时、前苏联等 20 多个国家采用 $37\sim 40^{\circ}\text{C}$ 体温快速解冻,挪威等国采用 75°C 高温超快速解冻^[4],均取得了良好的效果。但就世界范围而言,大都倾向于采用 $35\sim 40^{\circ}\text{C}$ 解冻。在本研究中,在 5 和 15°C 下解冻,精子活率受到严重影响,畸形率增加,在体温($37\sim 40^{\circ}\text{C}$)下解冻效果较好,在高温下短时间($2\sim 6$ s)解冻效果最好。造成世界范围内解冻温度不一致的原因,主要是牛品种的特异性及精子膜对冷冻解冻温度骤变的敏感性不同,膜受损伤的程度及精子的畸形率也不同,从而精子细胞表现出不同的活率^[5]。

解冻时,要求精子细胞尽快越过危险温区($-5\sim -25^{\circ}\text{C}$),避免低温对精子的损伤。在冷冻过程中,当温度降至 -5°C 时,精子细胞内、外水分均处于过冷状态,还未凝结成冰。在 $-5\sim -10^{\circ}\text{C}$,细胞外冰晶开始形成,细胞内仍处于过冷状态,细胞外因水分凝结渗透压上升,精子开始脱水,水分的脱出可

以防止细胞内形成冰晶而引发对细胞的损伤(物理损伤),细胞外高渗透压同样可以对细胞的膜造成损伤(溶液效应)^[6,7]。同样在解冻过程中也要降低物理损伤和溶液效应,为达到此目的,解冻必须要快速通过危险温区,尽量减少处于危险温区的时间^[8]。在本试验中低温长时间解冻,精子细胞受到的损伤严重,表现为顶体正常率显著低于高温快速解冻,而畸形率则显著高于高温快速解冻。

牛鲜精进入母畜生殖道后,保持受精的时间约为 28 h,精子的受精能力比其他活动能力要丧失得早。而本试验中,冷冻保存的精子保持运动能力的时间在 $9.5\sim 15.8$ h,远低于鲜精的存活时间。生产上多在牛发情后 $10\sim 12$ h 对牛进行输精,精子在生殖道的运行信号诱发了排卵,所以从输精到精卵相遇结合需要 $12\sim 18$ h。而低温保存的精子存活时间仅有 $9.5\sim 11.4$ h,显然不能在一次输精后就能受精。只有体温和高温解冻的精子才可能与卵母细胞相遇,从而引发受精过程。在本试验中,解冻温度越高,精子的存活时间越长,Vishwanath 等^[9]也得出了与此相似的结论。

观察精子的活率、顶体完整率和畸形率,目的是找出其与受胎率的关系。Januskauskas 等^[10]研究发现,牛冷冻精液解冻后的镜检活率与穿卵精子数及 56 d 不返情率呈极显著的正相关。Woelders 等^[11]分析了牛和猪冻精和鲜精受胎率后指出,精子活率和顶体形态指标可作为判断受胎率的指标。本试验所用细管冻精由西安种公牛站提供,该站细管冻精推广后的受胎结果与上述报道一致。

[参考文献]

- [1] Polge C, Rowson L E A. Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79°C [J]. Nature, 1952, 169: 626
- [2] 胡建宏, 王立强, 李青旺. 小尾寒羊精液冷冻温度曲线初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, (1): 85- 88
- [3] Medeiros CM O, Forell F, Oliveira A T D, et al. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? [J]. Theriogenology, 2002, 57: 327- 344
- [4] 钟世芳, 杨学时, 冯健超, 等. 家畜繁殖技术进展[M]. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社, 1979: 72
- [5] Watson P F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity [J]. Reprod Dom Anim, 1996, 31: 135- 140
- [6] Parks J E, Graham J K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes [J]. Theriogenology, 1992, 38: 209- 222
- [7] 于永生, 常万存, 李鹏, 等. 牛卵母细胞冷冻保存的研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2002, 30(2): 51- 54
- [8] Sukhato P, Thongsodseang S, Utha A, et al. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa [J]. Anim Reprod Sci, 2001, 67: 69- 77
- [9] Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state [J]. Anim Reprod Sci, 2000, 62: 23- 52
- [10] Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez Martinez H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from sedish AI bulls [J]. Theriogenology, 2001, 55: 947- 961
- [11] Waelders H. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen [J]. Vet Q, 1997, 19: 135- 138

Effects of different thawing methods on post-thawed motility of cryopreserved cow semen

BU Shu-hai¹, SUN Zhi-jie², LI Qin-wang², YU Yong-sheng², WANG Li-qiang², HU Jian-hong²

(1 College of Forestry, 2 College of Animal Sci-Tech, Northwest Sci-Tech University of

Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Sixty frozen bovine semen straws (0.25 mL) collected from five Holstein breeding bulls are thawed to determine the effects of different thawing temperature and times on properties of bull semen. The results show that: (1) With the increasing of thawing temperature, the proportion of motile spermatozoa, the proportion of acrosomal integrity, the motile length get improved significantly ($P < 0.05$). Abnormal spermatozoa rate decreased significantly with the increasing of thawing temperature ($P < 0.05$). (2) The percent of progressive spermatozoa thawed in 37 °C or 75 °C is higher with the increasing of thawing time, but the percent of progressive spermatozoa is no relation to thawing time. (3) There is no relation among thawing time and the proportion of motile spermatozoa, the proportion of acrosomal integrity, the motile length. It is suggested to thaw at 75 °C for 2~6 seconds in practice.

Key words: cow semen; thawed temperature; thawed time; semen quality

《畜牧兽医学报》2003 年征订启事

《畜牧兽医学报》是中国畜牧兽医学会主办,《畜牧兽医学报》编委会、中国农业科学院畜牧研究所编辑出版的全国性畜牧兽医学术刊物。创刊于 1956 年 7 月,读者对象为大、专院校的师生和各级畜牧兽医生产、科研工作者等。主要刊登较高水平的学术论文和专业研究报告以及对生产实践具有指导性、启发性的文章。本刊为全国中文核心期刊、中国自然科学核心期刊,并被国内外重要引文数据库及文摘性期刊收录。曾荣获“全国农口学会第一届优秀期刊奖”、“全国畜牧兽医学会第一届、第二届优秀期刊一等奖”、“北京市优秀期刊质量奖”、首届《CAJ-CD 规范》优秀奖等。

本学报为双月刊,104 页,每期定价 10.00 元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号:82-453;国内统一刊号:CN 11-1985/S;国外代号:BM 446;广告经营许可证:京海工商广字第 0326 号。编辑部地址:北京市海淀区圆明园西路 2 号中国农业科学院畜牧研究所;邮政编码:100094;电话:(010)62815987。