

白鹤冷冻精液人工授精实验

张敬^① 周军英^{①②} 赵锡森^① 刘玉平^①

① 北京动物园 北京 100044; ② 中国动物园协会 北京 100037

摘要: 为了探索鹤类精液冷冻保存和使用技术, 2003 ~ 2005 年, 进行了白鹤 (*Grus leucogeranus*) 的冷冻精液保存及人工授精实验。使用 Beltsville 家禽精液稀释液作为白鹤精液稀释液, 12% 的二甲基亚砜 (DMSO) 为冷冻液。精液样本冷冻经过三个阶段的降温, 最后保存在液氮中。成功保存了编号 93001 雄性白鹤精液 36 支 (0.2 ml/支)。冷冻精液在 0 ~ 4℃ 冰水中解冻 3 ~ 5 min, 解冻后白鹤精液精子活率为 29.3% ± 15.5% ($n = 16$), 2004 和 2005 年分别为 92101 号雌鹤产的两窝卵进行人工授精实验, 2 年共产卵 5 枚, 其中 1 枚卵受精并成功孵化。实验发现在雌鹤产卵前一周和产卵期间每天输精, 并增加每次输精量, 同时在每产完 1 枚卵后 4 h 内完成一次输精, 效果最佳。

关键词: 冷冻精液; 稀释液; 冷冻液; 精子活率; 白鹤

中图分类号: Q492 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2014)06-925-05

Artificial Insemination with Cryopreserved Semen in Siberian Crane (*Grus leucogeranus*)

ZHANG Jing^① ZHOU Jun-Ying^{①②} ZHAO Xi-Sen^① LIU Yu-Ping^①

① *Beijing Zoo, Beijing 100044*; ② *Chinese Association of Zoological Gardens, Beijing 100037, China*

Abstract: Cryopreservation of semen is a useful technology for maximizing fertility and genetic diversity when breeding endangered species in captivity. In order to explore the technology of artificial insemination of rare crane in captivity, a semen cryopreservation test in Siberian Crane (*Grus leucogeranus*) was conducted at Beijing Zoo from 2003 to 2005. The semen of Siberian Crane was collected and preserved by freezing, and the frozen semen was used subsequently for insemination. From fifteen semen collections, thirty-six 0.2 ml samples were frozen. Frozen semen was thawed for AI sixteen times. The Beltsville Poultry Semen Extender was used. We adjusted pH to 7.8, and the osmotic pressure to 300 mosm/L (773 kPa) with distilled water, and used 12% dimethylsulfoxide (DMSO) as the freezing solution to protect the spermatozoa from damage during cryopreservation. Semen was diluted 3.2 ± 1.1 times of the volume of crane extender when collected. 12% DMSO was added, in half volume of the diluted ejaculate, and DMSO and diluted ejaculate were at the same temperature (0 ~ 4℃) when they were mixed. The ejaculate was equilibrated with DMSO for 15 min at 0 ~ 4℃ in the freezer. The samples were put into 0.2 ml each in freezing tubes for cryopreservation. Frozen semen was kept in the liquid nitrogen following three temperature-fall steps: 4 ~ -20℃, -20 ~ -80℃, -80 ~ -196℃. Frozen semen was thawed in 0 ~ 4℃ water for 3 ~ 5 min, and the semen was used for insemination immediately after thawing. The rate of living spermatozoa after thawing was 29.3% ± 15.5% ($n = 16$). Insemination of the Siberian Crane with frozen semen was conducted each day during egg laying period, within

four hours after egg laying, using the equivalent of two to four ejaculates to make up the loss of spermatozoa during freezing. Artificial insemination by frozen semen was conducted for two clutches of eggs in 2004 and 2005. One egg was fertilized among five eggs laid in two years, and one chick was successfully bred from frozen semen.

Key words: Frozen semen; Extender; Freezing solution; Rate of living sperm; Siberian Crane (*Grus leucogeranus*)

1969年第一次对鹤进行了人工授精,作为一门实用的繁殖技术,人工授精已经应用于鹤类繁殖和提高受精率(Ellis et al. 1996)。1941年首次成功将鸡(*Gallus gallus domesticus*)的精液进行了低温保存(Shaffner et al. 1941),从此,在多种鸟类中利用低温保存精液进行人工授精获得了成功(Gee et al. 1985)。冷冻保存的鸟类精液,可以在需要时随时解冻使用,还可在国内和国际间交换,用以防止近亲繁殖,保持笼养个体的基因多样性。所以精液的冷冻保存对于开展远距离的人工授精和保存优质基因有重要的意义(张雁云 2000)。

鹤类精液冷冻时需要使用鹤类精液稀释液、冷冻液,精液按照一定的步骤经过低温处理后,长久保存在液氮中。使用冷冻精液人工授精时,需要将精液解冻后尽快完成输精。由于在冷冻过程中有50%~60%的精子损失,所以用冷冻精液输精时与使用鲜精液输精不同,为了提高卵的受精率,一般输入相当于2~4倍鲜精液输精量(Ellis et al. 1996)。虽然解冻后精子活率是评估冷冻精液质量的指标,但与鲜精输精一样,检验冷冻精液人工授精成功与否的最可靠依据还是卵的受精率。1994年国内首次将笼养白枕鹤(*Grus vipio*)的冷冻精液用于人工授精,获得成功(张玲等 1994)。

为了探索鹤类精液冷冻保存和使用技术,2003~2005年,采集了白鹤(*G. leucogeranus*)精液进行冷冻保存,筛选了合适的稀释液、冷冻液和冷冻仪器。用白鹤冷冻精液进行人工授精得到1枚受精卵,成功繁殖白鹤1只。

1 研究对象和方法

1.1 研究对象 研究对象为北京动物园饲养

的2只白鹤,雌鹤与雄鹤隔笼单独饲养,雌鹤产卵规律。雄鹤编号93001,1991年出生;雌鹤编号92101,1992年出生。雄鹤和输精的雌鹤均身体健康,处于繁殖年龄。北京动物园的笼养白鹤每年4月开始繁殖。白鹤窝卵数为2枚,产卵间隔一般为2~3 d,如果雌鹤产的第一窝卵被拿出,间隔7~10 d后,一般还会产下第二窝卵。卵孵化期为29 d。

1.2 精液稀释液的配置 低温保存鹤类精液时,使用Beltsville家禽精液稀释液,只要将稀释液的pH与渗透压做相应的调整,就可以用于不同种鹤精液的冷冻保存(Ellis et al. 1996)。使用冰点渗透压仪测得白鹤精液渗透压为300 mosm/L (773 kPa)。将Beltsville家禽精液稀释液pH调整为7.8(Gee et al. 1985),渗透压调整为300 mosm/L (773 kPa),作为冷冻保存白鹤精液的稀释液。

1.3 精液采集和短期保存 使用按摩法采集93001号雄性白鹤精液。采集到的精液用白鹤精液稀释液进行2.0~4.7倍稀释,移到冻存管内密封、记录,于0~4℃冰水中暂时保存,30 min之内在实验室进行活率和密度检测。

1.4 精液的冷冻保存 白鹤精液冷冻保存参考了鹤类基金会使用的鹤类精液冷冻保存方法(Ellis et al. 1996)。将需冷冻保存的精液于0~4℃加入稀释后精液量一半体积的冷冻液[12%的二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)],0~4℃平衡15 min。平衡后检测活力并记录。之后分装在冻存管中进行冷冻保存,0.2 ml/支。

冷冻过程需要三步:使用程序降温盒(NALGENE Cryo 1℃ Freezing Container Cat. No. 5100-0001)和一台索尼-70℃低温冰箱

完成 4 ~ -20℃ 的降温过程, 将装有待冻精液的冻存管放入程序降温盒中, 一同放入 -70℃ 低温冰箱中, 用探头式电子温湿度计 (ETH529) 监测盒中温度下降过程, 1℃/min 匀速降温。利用液氮完成 -20 ~ -80℃ 的降温过程, 将冻存管迅速放在距液氮面约 5 cm 的塑料架子上, 保持 1 min, 降温速度平均 50℃/min, 此过程用探头式低温温度计检测温度, 此处的温度约为 -74.2℃。将冻存管直接浸入液氮进行 -80 ~ -196℃ 的降温。最终在液氮中将冻存管放在事先做好标记的套管中, 转移到盛有液氮的储存罐中保存。

1.5 冷冻精液的解冻和输精 进行人工授精时, 将存放精液的冻存管从液氮罐中取出, 浸入冰水中 3 ~ 5 min, 待精液融化后, 取出冻存管, 将精液吸入 1 ml 注射器中立即进行人工输精 (Ellis et al. 1996)。2004 年 92101 号雌鹤产卵期间, 每天解冻冷冻精液输精 1 次, 如果雌鹤产卵, 则在产卵后 4 h 内完成 1 次输精, 每次输入 1 ~ 2 支冷冻精液。2005 年雌鹤产卵期间, 每两天输精 1 次, 若雌鹤产卵, 则在产卵后 4 h 内完成 1 次输精, 每次输入 1 支冷冻精液。在每次输精之前操作人员先捕捉雌鹤, 用手触摸雌鹤腹部, 检查当天是否即将产卵, 若通过触摸判断雌鹤很快产卵, 则等这枚卵产下以后再作冷冻输精。

用按摩法给雌鹤输精。将已吸入 1 ml 解冻后精液的玻璃注射器轻轻地插入雌鹤泄殖腔, 在左侧壁探寻, 找到一个较松软的开口部位, 即为输卵管开口, 将注射器轻轻插入开口, 推入注射器内的精液。

1.6 精子的密度及活率检测方法 实验室中, 取稀释后的白鹤精液 2 μ l, 用盐水杀死精子, 在 40 倍显微镜观察计数, 记录结果, 计算出精子密度。精子密度 (个/ml) = (2 μ l 稀释后精液中的精子数/0.002) \times 稀释倍数, 稀释倍数 = 鹤类精液稀释液量/精液量。

使用伊红-苯胺黑 (eosin-nigrosin) 染色法检测精子活力 (Ellis et al. 1996): 载玻片上放 4 μ l 精液与 4 μ l 的 5% 伊红 (eosin) 溶液混合,

8 min 后加入 12 μ l 5% 苯胺黑 (nigrosin) 溶液, 用盖玻片拉成薄层, 用吹风机吹干, 在显微镜下观察计数, 透明的为活精子, 染红的为死精子。精子活率 = (活精子总数/精子总数) \times 100%。

1.7 卵的孵化和受精卵的确定 92101 号雌鹤产卵后, 尽快取出, 将卵换入自然孵卵的其他雌鹤腹下, 孵卵 15 d 后, 再将卵取出放入孵卵机内孵育, 直到出雏。孵卵过程中的第 10 天和第 20 天进行验卵, 可以确定卵是否受精, 受精卵在孵育 3 d 以后, 照卵时透过卵壳隐约可见蛛网状血管网从中心点辐射开来, 随着胚胎的发育, 血管增大, 延卵黄周围蔓延。白鹤卵壳较厚, 照卵时无法看到卵中的胚胎, 在孵卵过程中的第 10 天和第 20 天通过观察卵的晃动验卵。在孵育 10 d 以后平放在桌面上, 可以观察到卵微微晃动, 孵育 20 d 后, 可以观察到卵明显晃动, 孵卵时间超过白鹤孵卵期 2 ~ 3 d 未见晃动的卵, 打开卵壳也可以确定卵是否受精。雏鹤孵化出壳后进行人工养育。

2 结 果

2.1 白鹤精液品质 2003 年和 2004 年共采集 93001 号雄性白鹤精液 15 次, 精液质量好, 呈乳白色黏稠状, 平均采精量 (0.1 \pm 0.04) ml。精子密度 (6.1 \pm 9.6) \times 10⁸ 个/ml, 精子活率 88% \pm 3.6% ($n = 15$)。精液渗透压 300 mosm/L (773 kPa)。

2.2 精液解冻和输精 冷冻保存了 93001 号雄性白鹤精液 36 支 (0.2 ml/支), 解冻输精 16 次 (表 1), 解冻后精液中精子活率 29.3% \pm 15.5% ($n = 16$)。2004 年 92101 号雌鹤产卵 2 枚, 产卵期间每天解冻输精 1 次, 输精量 (0.41 \pm 0.12) ml/次 ($n = 9$), 其中 1 枚卵受精。2005 年 92101 号雌鹤产卵 3 枚, 产卵期间每 2 d 解冻输精 1 次, 输精量 (0.2 \pm 0.01) ml/次 ($n = 7$), 3 枚卵均未受精。

雌鹤 92101 产卵比较规律, 每窝产 2 枚卵, 两窝卵之间间隔 7 ~ 10 d。2004 年雌鹤 4 月 22 日和 25 日产一窝卵, 在此之前一周到产

表 1 92101 号雌性白鹤冷冻精液输精统计表

Table 1 Artificial insemination by frozen semen of Siberian crane

输精日期(年-月-日) Date (Year-month-date)	解冻精液的精子活率 Motility rate of frozen sperm (%)	输精量 Amount of frozen sperm input (ml)
2004-04-19	10.0	0.33
2004-04-20	10.0	0.22
2004-04-21	22.4	0.63
2004-04-22	20.0	0.48
2004-04-23	23.3	0.45
2004-05-01	32.0	0.45
2004-05-03	22.0	0.38
2004-05-04	37.0	0.41
2004-05-05	12.0	0.32
2005-04-15	20.0	0.23
2005-04-18	30.0	0.21
2005-04-20	65.0	0.20
2005-04-21	55.0	0.20
2005-05-03	30.0	0.22
2005-05-06	40.0	0.19
2005-05-08	40.0	0.19

卵期间使用冷冻精液输精, 每天解冻输精 1 次, 且在雌鹤每产完 1 枚卵后 4 h 内完成一次输精, 同时增加每次输精量, 输入 2 支或 2 支以上的冷冻精液量, 2 枚卵中 4 月 25 日所产的第 2 枚卵受精。此枚卵经孵化后顺利出雏, 雏鹤 04501 号经过人工养育成活。

2005 年雌鹤产卵之前一周到 4 月 21 日、4 月 24 日和 5 月 2 日所产的 3 枚卵期间, 每 2 天输精 1 次, 雌鹤每产完 1 枚卵后, 4 h 内完成 1 次输精, 每次输入 1 支冷冻精液。结果 2005 年产的 3 枚卵, 均未受精。

3 讨论

3.1 冷冻精液与鹤卵的受精 精子被输入到雌鹤输卵管后, 在那里能够存活一段时间。通过实验发现家鸡一次交配后, 个体单独饲养观察, 最长受精日期为 35 d, 火鸡 (*Meleagris gallopavo*) 在一次交配后的第 70 天尚可产出受精卵 (郑光美 1995)。鹤类精子在雌鹤输卵管中也能存活较长时间, 2006 年我们得到黑颈鹤

(*G. nigricollis*) 的 1 枚受精卵是在最后一次鲜精稀释输精后的第 12 天产下的, 这说明黑颈鹤精子在雌鹤输卵管中至少可以存活 12 d。

经实验证明, 鸟类精液经冷冻后精子活率下降, 存活时间也缩短。家鸡精液解冻后平均活率为 56%; 解冻后精子活率 5 min 就开始下降, 20 min 下降明显, 1 ~ 1.5 h 精子全部死亡 (李世英等 1995)。Gee 等 (1985) 认为使用鹤类解冻精液进行人工授精时, 要得到理想的受精率, 每次授精至少要输入 150 000 ~ 200 000 个精子。白枕鹤精液冷冻后, 精子活率 30% 左右, 为提高卵受精率, 研究人员建议在产完第 1 枚卵后可进行早晚两次输精 (张玲等 1994)。

我们进行白鹤冷冻精液实验解冻后精子平均活率为 29.3%, 从实验结果看, 产卵期间每天输精, 增加每次输精量, 弥补精液冷冻过程中精子的损失, 同时在最佳时机输精, 即在雌鹤产完一枚卵后 4 h 内尽早完成输精, 是今后白鹤冷冻精液输精的首选方法。

致谢 感谢北京师范大学张雁云教授、北京动

物园张金国副园长、张恩权副科长、刘斌副队长以及杨明海、刘赫、王志坚对本研究的支持与帮助。

参 考 文 献

Ellis D H, Gee G F, Mirande C M. 1996. CRANES: Their Biology, Husbandry, and Conservation. Washington, DC: Department of the Interior, National Biological Service, Baraboo, WI: International Crane Foundation, 215, 220, 221.

Gee G F, Bakst M R, Sexton T J. 1985. Cryogenic preservation of semen from the Greater Sandhill Crane. *The Journal of Wildlife Management*, 49(2): 480 - 484.

Shaffner C S, Henderson E W, Card C G. 1941. Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions. *Poultry Science*, 20(3): 259 - 265.

李世英, 李焕玲, 胡松庭, 等. 1995. 鸡精液冷冻技术研究. *山东农业科学*, 4: 50 - 52.

张玲, 刘大军, 宋艳珠, 等. 1994. 白枕鹤精液冷冻技术的研究. *黑龙江动物繁殖*, 2(1): 7 - 8.

张雁云. 2000. 鸟类的人工授精 // 中国鸟类学会, 台北市鸟类学会, 中国野保护学会. *中国鸟类学研究: 第四届海峡两岸鸟类学术研讨会文集*. 北京: 北京林业出版社, 237 - 333.

郑光美. 1995. *鸟类学*. 北京: 北京师范大学出版社, 93 - 94.