

# 秦岭大熊猫精液的细管冷冻保存

车利锋<sup>①</sup> 封托<sup>①</sup> 马清义<sup>②</sup> 裴俊峰<sup>①</sup> 金学林<sup>②</sup> 吴晓民<sup>①\*</sup>

① 陕西省动物研究所 西安 710032; ② 陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心 陕西 周至 710402

**摘要:**2008年3月1日至4月27日和2009年3月3日至5月1日,在陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心对处于繁殖期内的4只雄性秦岭大熊猫(*Ailuropoda melanoleuca qinlingensis*)精液进行了细管冻精实验。比较组成不同的4种稀释液:葡萄糖-果糖-柠檬酸三钠-卵黄-甘油-双抗(稀释液1)、葡萄糖-蔗糖-柠檬酸三钠-卵黄-甘油-双抗(稀释液2)、葡萄糖-柠檬酸三钠-卵黄-甘油-双抗(稀释液3)和美国进口的TEST(加入3.5%甘油),以及直接降温平衡法(方法1)与逐级降温平衡法(方法2)2种冷冻保存操作方法,对秦岭大熊猫精液进行细管冷冻保存后精子活力和顶体完整率的影响。结果表明:稀释液1的精子活力为 $46.25\% \pm 11.67\%$ ,顶体完整率为 $80.75\% \pm 7.89\%$ ,TEST的精子活力为 $48.75\% \pm 8.54\%$ ,顶体完整率为 $84.50\% \pm 7.59\%$ ,两者的精子活力和顶体完整率均无明显差异( $P > 0.05$ ),但是都明显高于稀释液2( $P < 0.01$ )和稀释液3( $P < 0.01$ );采用方法1冷冻保存秦岭大熊猫精液,解冻后精子的活力和顶体完整率分别为 $45.67\% \pm 10.54\%$ 和 $81.37\% \pm 8.42\%$ ,都显著高于方法2( $P < 0.01$ );方法1解冻后畸形率为 $23.50\% \pm 3.51\%$ ,明显低于方法2( $P < 0.01$ )。经比较确定,方法1(用稀释液1)是一种较好的细管冷冻保存秦岭大熊猫精液的方法。

**关键词:**秦岭大熊猫;精液;细管冷冻保存

中图分类号:Q492 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2012)04-55-07

## Straw Cryopreservation of Semen of Giant Panda from Qinling Mountains

CHE Li-Feng<sup>①</sup> FENG Tuo<sup>①</sup> MA Qing-Yi<sup>②</sup> PEI Jun-Feng<sup>①</sup>  
JIN Xue-Lin<sup>②</sup> WU Xiao-Min<sup>①\*</sup>

① Shaanxi Institute of Zoology, Xi'an 710032;

② Shaanxi Rare Wildlife Rescue and Breeding Research Center, Zhouzhi, Shaanxi 710402, China

**Abstract:** From March 1st to April 27th, 2008 and from March 3rd to May 1st, 2009, the semen samples from four breeding Giant pandas which distributed in Qinling Mountains (*Ailuropoda melanoleuca qinlingensis*) were used for semen cryopreservation experiments in Shaanxi Rare Wildlife Rescue and Breeding Research Center. The sperm motility and acrosome integrity were tested after straw cryopreservation of semen with 4 diluents, glucose-fructose-trisodium citrate-yolk-glycerin-antibiotics, glucose-sucrose-trisodium citrate-yolk-glycerin-antibiotics, glucose-trisodium citrate-yolk-glycerin-antibiotics, and TEST imported from the USA (added with 3.5% glycerin), and with 2 methods, direct cooling balance method, and gradual cooling balance method. The results showed that the percentages of sperm motility and intact acrosome were  $46.25\% \pm 11.67\%$  and  $80.75\% \pm 7.89\%$  respectively in diluent 1;  $48.75\% \pm 8.54\%$  and  $84.50\% \pm 7.59\%$  in diluent TEST. There

**基金项目** 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项项目(No. 2008ZDKG-77), 陕西省科学院重大科研项目(No. 2007ZD-01), 陕西省自然科学基金项目(No. 2009JM3012);

\* 通讯作者, E-mail: wuxiaomin66@163.com;

**第一作者简介** 车利锋, 男, 助理研究员; 研究方向: 野生动物驯养繁育; E-mail: xingyu2081@sina.com。

收稿日期: 2012-02-10, 修回日期: 2012-04-28

was no significant difference between these two diluents ( $P > 0.05$ ), but both were better than diluent 2 and diluent 3 ( $P < 0.01$ ). After freezing and thawing, the percentages of sperm motility and intact acrosome were  $45.67\% \pm 10.54\%$  and  $81.37\% \pm 8.42\%$  respectively in cryopreservation method 1, significantly higher than those of method 2 ( $P < 0.01$ ). The percentage of sperm abnormality was  $23.50\% \pm 3.51\%$ , in method 1, significantly lower than that of method 2 ( $P < 0.01$ ). Thus, we conclude that method 1 (with diluent 1) is good for semen straw cryopreservation in Giant Panda.

**Key words:** Giant Panda in Qinling Mountains; Semen; Straw cryopreservation

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 隶属于熊科大熊猫属, 包括 2 个亚种, 指名亚种 (*A. m. melanoleuca*) 与秦岭亚种 (*A. m. qinlingensis*), 它们在距今 10 000 ~ 12 000 年的晚更新世冰川末期就已经开始分化<sup>[1]</sup>。在漫长的进化历程中, 因秦岭地区大熊猫进化比较慢, 数量相对较少, 因此在遗传多样性上也更具有研究价值<sup>[1]</sup>。大熊猫秦岭亚种主要分布在陕西境内的秦岭南坡, 根据陕西省第三次大熊猫调查及凤县屋梁山大熊猫调查结果显示, 陕西秦岭分布的野生大熊猫分为 6 个种群, 总共约 273 只<sup>[2]</sup>。

正是因为野外生活的大熊猫秦岭亚种分布独特、数量稀少<sup>[3]</sup> 以及其圈养数量较少的现状, 所以通过秦岭大熊猫精液的细管冷冻保存研究, 可以使遗传性能好的雄性个体的精液得以长期保存, 从而不但为秦岭大熊猫人工授精技术的开展提供了基础, 而且在提高秦岭大熊猫繁殖性能, 扩大种群数量等方面都有着重要意义。目前, 国家主管部门已出台了各种就地与迁地保护措施, 只需各方通力合作, 野生大熊猫的未来将是光明的<sup>[4]</sup>。近年来, 在圈养大熊猫精液冷冻保存方面, 已有学者进行了研究<sup>[5-6]</sup>, 但是关于秦岭大熊猫, 目前还没有相关报道。本研究的目的是通过对陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心处于繁殖期内的 4 只雄性秦岭大熊猫的精液进行细管冷冻对比实验, 从而为建立大熊猫秦岭亚种优良种质基因库以及秦岭大熊猫人工授精技术的顺利实施提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 研究选用陕西省珍稀野生

动物抢救饲养研究中心圈养的 4 只成年雄性秦岭大熊猫, 年龄 12 ~ 25 周岁, 除 1 只为圈养条件下出生, 其余 3 只均在野外出生, 具体情况如下。

1 号: 13 岁, 1999 年于圈养条件下出生, 体重 110 kg, 体况良好, 睾丸发育较好。

2 号: 14 岁, 野外出生, 体重 100 kg, 体况良好, 睾丸发育良好。

3 号: 18 岁, 野外出生, 体重 123 kg, 体况良好, 但是左侧睾丸发育不好。

4 号: 25 岁, 野外出生, 体重 125 kg, 体况较好, 有眼疾(已手术), 睾丸发育良好。

**1.1.2 仪器和试剂** 电刺激采精仪(美国生产), 精子分析仪(Sperm 1.1 Album 3.0), 液氮罐(成都金凤液氮容器有限公司), 高压灭菌器, 干燥箱, 电冰箱, 集精杯, 温度计, 0.25 ml 冷冻细管, 泡沫箱, 冷冻架, 秒表, 镊子, 试管, 试管架, 记号笔, 移液枪等; 液体石蜡, 生理盐水, 蒸馏水, 鸡蛋, 甘油, 葡萄糖(分析纯)等配置冷冻保护液的试剂。

### 1.2 方法

**1.2.1 精液采集** 采用电刺激采精法进行秦岭大熊猫精液的采集<sup>[5,7-8]</sup>。

**1.2.2 精液分配方案** 把采出的总共 12 份符合要求的大熊猫精液每份都分成 6 等份, 这样就有相等的 6 组份精液, 其中 4 组份进行精液冷冻保护液的筛选实验, 2 组份进行不同冷冻操作方法的筛选实验。

**1.2.3 细管冻精操作** 本研究中共选用 4 种精液冷冻保护稀释液进行解冻后精子质量的对比实验。各种冷冻保护稀释液都是以 100 ml 超纯水作为溶剂, 其余的试剂固体为质量(单

位:g),液体为体积(单位:ml)。冷冻保护稀释液1(葡萄糖5%-果糖5%-柠檬酸三钠0.01%-卵黄18%-甘油3.5%-双抗各10万IU)、冷冻保护稀释液2(葡萄糖7%-蔗糖3%-柠檬酸三钠0.01%-卵黄18%-甘油3.5%-双抗各10万IU)、冷冻保护稀释液3(葡萄糖10%-柠檬酸三钠0.01%-卵黄20%-甘油3.5%-双抗各10万IU)、冷冻保护稀释液4是美国进口的TEST稀释液(加入3.5%甘油),因为实验操作环境关系,而且TEST稀释液中已经加入了双抗,所以在前3种冷冻保护稀释液中也加入了双抗,这样主要是抑制环境中的有害细菌。参照现代动物繁殖技术中良好的精液冷冻稀释液所具备的6方面的作用,在熊科动物现用稀释液的基础上制订出上述稀释液。在对精液进行保存的过程中主要选用以下2种方法:方法1,首先对采集的精液用精子分析仪和显微镜、红血球计数器、精密pH试纸进行常规品质的检查,达到输精要求的精液才可以进行冷冻保存,不符合要求的弃用。把符合要求的精液移入带盖的离心管中,按合适的比例向其中加入冷冻稀释液,缓慢摇动使其充分混匀,用移液枪取出微量精液进行镜检,活率达到输精要求,即放入冰箱中平衡3h,然后向其中加入甘油,使其充分混匀,放回冰箱中继续平衡0.5h,平衡结束后进行装管:用移液枪把精液吸入冷冻细管中,封口;把封好的细管放在平衡好的冷冻网上,立即放到已经置入液氮的高冷冻架上60s,再放到已经置入液氮的低冷冻架上60s,然后置入液氮中,3~4min后,做好标记放入液氮罐中保存,并记录。方法2,首先按照方法1进行精液的常规检查,达到输精要求的精液才可以进行冷冻保存。向符合输精要求的鲜精中按合适的比例加入稀释液,放在30℃水浴箱的试管架上降温30min,再将其放在14~16℃的室温中降温30min,然后再按合适的比例滴入已经加入甘油的冷冻保护液,直接放入冰箱中平衡3.5h,平衡结束后进行装管:装管方法同方法1,然后把封好的细管放在平衡好的冷冻网上,同样立即放到已经置入液氮的高冷冻架上60s,再放

到已经置入液氮的低冷冻架上60s,然后置入液氮中,3~4min后,做好标记放入液氮罐中保存,并记录。

**1.2.4 冻精解冻** 将低温冻存的精液细管从液氮罐中取出后,用镊子夹着一端浸入37℃的恒温水浴箱中(有封口粉的一端朝上),并慢慢摆动60s,然后立即从水中拿出并擦干,按照动物精液品质常规检查的方法<sup>[8-9]</sup>,取出少量精液进行镜检。

**1.2.5 冷冻精液质量评价指标与方法** 精子活力测定,以往对大熊猫精子活力的评估是把精液滴到置于37℃恒温载物台上的载玻片上,压片后用显微镜进行目测评估<sup>[8,10-11]</sup>。本项研究中采用精子分析仪(Sperm 1.1 Album 3.0)直接进行精子活力的测定:把精液滴到置于37℃恒温载物台上的载玻片上,压片后用精子分析系统进行视频录像,用软件分析系统进行分析,自动生成大熊猫精子活力的数值。顶体完整率采用Rose Bengal/Fast Green Stain法染色检查<sup>[11-12]</sup>,具体操作:把染色后的精液涂片置于显微镜下,采用随机取样法抽取5个视野分别进行计数,在每个视野下都计数得出顶体完整的精子数和总精子数,这样就得出每个视野下顶体完整率,5个视野下的顶体完整率求平均数就得出总的顶体完整率。畸形率采用0.25%龙胆紫溶液染色检查,具体操作方法同顶体完整率的操作方法,采用随机抽样法,最后得出精子的畸形率。所有检查评估工作均由1人完成。

**1.2.6 统计分析** 实验数据中,4只大熊猫鲜精指标用平均数来表示,其余都使用平均值±标准差来表示。对精液在4种不同冷冻保护稀释液和2种不同冷冻保存操作方法下的差异使用平均数差异显著性检验中的*t*-检验方法进行统计分析, $P < 0.05$ 认为差异显著, $P < 0.01$ 认为差异极显著。

## 2 结果

**2.1 新鲜精液指标** 经过人工电刺激所获得4只大熊猫符合要求的鲜精,具体指标见表1。

表 1 4 只大熊猫精液指标

Table 1 Semen index of four giant pandas

| 编号<br>Number | 活力 (%)<br>Percentage of motility | 畸形率 (%)<br>Percentage of abnormality | 顶体完整率 (%)<br>Percentage of intact acrosome |
|--------------|----------------------------------|--------------------------------------|--|
| 1            | 71.00                            | 10.67                                | 90.00                                      |
| 2            | 82.50                            | 8.50                                 | 93.25                                      |
| 3            | 53.50                            | 13.50                                | 86.00                                      |
| 4            | 61.33                            | 15.33                                | 76.67                                      |

**2.2 冷冻保护稀释液配方的筛选结果** 把已经分好进行精液冷冻保护稀释液筛选实验的 4 组份大熊猫精液(每组 12 份)分别用 4 种冷冻保护稀释液,采用方法 1 进行冷冻保存。解冻后,采用稀释液 1 和 TEST 2 种冷冻保护稀释液进行冻存后的精液精子活力均达到输精要求:精子活力大于 30% 且顶体完整率均在 70% 以上;稀释液 2 和稀释液 3 两种冷冻保护稀释液进行冻存后的精子活力均未达到输精要求。经 *t*-检验,解冻后精子活力,稀释液 1 略低于 TEST 稀释液,差异不显著 ( $P > 0.05$ ),但是极显著高于稀释液 2 和稀释液 3 ( $P < 0.01$ );解冻后精子畸形率,稀释液 1 略高于 TEST 稀释液,差异不显著 ( $P > 0.05$ ),但是明显低于稀释液 2 和稀释液 3,差异极显著 ( $P < 0.01$ );解冻后精子顶体完整率,释液 1 略低于 TEST 稀释液,差异不显著 ( $P > 0.05$ ),但是同样明显高于稀释液 2 和稀释液 3,差异极显著 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。

**2.3 不同冷冻方法的冻存结果** 把已经分好的进行不同冷冻保存操作方法筛选实验的 2 组份大熊猫精液(每组 12 份),都加入冷冻保护稀释液 1,2 组精液分别采用方法 1 和方法 2 进行冷冻保存,解冻后对精子活力、畸形率和顶体完整率进行比较。经 *t*-检验,采用方法 1 冷冻保存秦岭大熊猫精液,精子活力明显高于方法 2,差异极显著 ( $P < 0.01$ );畸形率明显低于方法 2,差异极显著 ( $P < 0.01$ );顶体完整率明显高于方法 2,差异极显著 ( $P < 0.01$ ) (表 3)。

**2.4 冷冻保存前后大熊猫精液状态** 从奥林巴斯显微镜 (40 × 10 倍) 下观察鲜精和解冻后精液情况 (图 1),可以直观地比较冷冻保存前

表 2 不同冷冻稀释液精子冷冻效果的比较

Table 2 The comparison of different freezing diluents

| 冷冻<br>稀释液<br>Cryoprotectants | 冻后活力<br>Percentage of motile<br>frozen-thawed<br>sperm<br>(%) | 冻后畸形率<br>Percentage of abnormal<br>frozen-thawed<br>sperm<br>(%) | 冻后顶体完整率<br>Percentage of intact<br>frozen-thawed<br>acrosome<br>(%) |
|------------------------------|---|--|---|
| 稀释液 1<br>Diluent 1           | 46.25 ± 11.67   | 23.50 ± 3.51   | 80.75 ± 7.89  |
| 稀释液 2<br>Diluent 2           | 22.75 ± 3.66  | 35.50 ± 3.70   | 58.25 ± 6.85  |
| 稀释液 3<br>Diluent 3           | 13.25 ± 3.66  | 41.50 ± 5.32   | 51.50 ± 2.38  |
| TEST                         | 48.75 ± 8.54  | 21.25 ± 4.20   | 84.50 ± 7.59  |

表 3 不同冷冻方法的冷冻效果比较

Table 3 Comparison between computerized slow freezing and static liquid nitrogen vapor freezing

| 冷冻方法<br>The method of freezing | 冻后活力<br>Percentage of motile<br>frozen-thawed<br>sperm<br>(%) | 冻后畸形率<br>Percentage of abnormal<br>frozen-thawed<br>sperm<br>(%) | 冻后顶体完整率<br>Percentage of intact<br>frozen-thawed<br>acrosome<br>(%) |
|--------------------------------|---|--|---|
| 方法 1<br>Method 1               | 45.67 ± 10.54   | 23.50 ± 3.51   | 81.37 ± 8.42  |
| 方法 2<br>Method 2               | 20.25 ± 8.02  | 36.75 ± 4.43   | 64.25 ± 7.63  |

后精液中精子的具体变化情况。经过冷冻保存后的精液,其畸形率明显比鲜精的高,畸形表现在顶体畸形、颈部畸形以及尾部畸形三方面。其中顶体畸形表现为顶体受损、顶体丢失以及顶体松散;颈部畸形只表现为颈部弯曲;尾部畸形表现为卷尾、中段弯曲含胞浆小滴、中段弯曲无胞浆小滴、尾弯曲含胞浆小滴、尾弯曲无胞浆小滴、近端含胞浆小滴、远端含胞浆小滴以及尾部断裂等。

### 3 讨论

**3.1 冷冻操作过程中的注意事项** 在精液的冷冻保存过程中,一定要保证原精液的品质,因为精液超低温冷冻保存过程中,原精液品质的好坏直接影响精液的冻存效果,这从实验结果

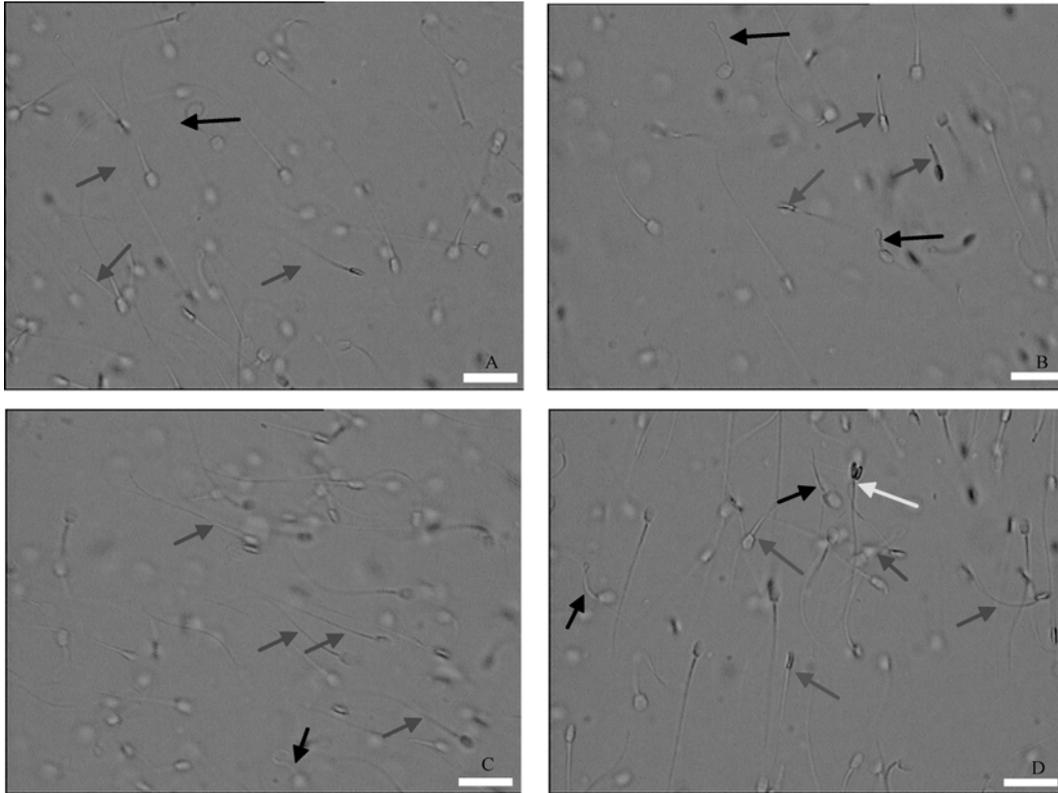


图 1 大熊猫精子畸形率及冷冻保存前后精液状态(40 × 10)

Fig.1 Percentage of abnormal sperm and the state of sperm before and after cryopreservation

- A. 品质好的鲜精,其精子畸形率低:黑色箭头示卷尾的畸形精子,蓝色箭头示正常精子;  
 B. 品质较差的鲜精冻存后精子畸形率高:黑色箭头示卷尾,蓝色箭头示尾部断裂,红色箭头示顶体受损;  
 C. 品质较好的鲜精冻存后精子畸形率低:黑色箭头示畸形的精子,蓝色箭头示正常的精子;  
 D. 不同畸形精子的形态:黑色箭头示卷尾的精子,蓝色箭头示尾部断裂,红色箭头示顶体受损,黄色箭头示双头。标尺 = 20 μm。
- A. Fresh semen with better quality: percentage of sperm abnormality is low. Black arrow: deformed sperm with curled tail; blue arrow: normal sperm. B. Percentage of abnormal frozen-thawed sperm is high. Black arrow: curled tail; blue arrow: tail fracture; red arrow: damaged acrosome. C. Percentage of abnormal frozen-thawed sperm is low. Black arrow: deformed sperm; blue arrow: normal sperm. D. Different deformities of sperm: Black arrow: curled tail; blue arrow: tail fracture; red arrow: damaged acrosome; yellow arrow: double heads. Bar = 20 μm.

冷冻保存前后大熊猫精液状态(图1)中可以明显看到,鲜精品质好的,冷冻保存后再解冻镜检,其品质也好,主要表现在精子畸形率较低、顶体完整率较高,而鲜精液品质差的,冷冻保存后再解冻,其品质也差,主要体现在解冻后精子的畸形率较高、顶体完整率较低。

从对采出的原精立即进行常规品质检查开始,到精液的平衡、装管、冻存,每个环节都要进行精液重要指标的检查,活力达到输精要求,才能继续进行实验操作。因为哺乳动物的精子在

37 ~ 38℃时运动速度最快,所以每个稀释液温度都应略微低于37℃,以防止精子机能的变化,从而影响冷冻保存效果。装管一定要在冰箱中进行,而且速度要快,尽量使精液保持在平衡时的温度范围,以免精子遭受冷打击。

**3.2 不同冷冻保护稀释液配方的筛选** 从4种不同冷冻保护稀释液对秦岭大熊猫精液细管冷冻保存的结果来看,稀释液1解冻后精子的活力、畸形率和顶体完整率明显高于稀释液2和稀释液3,差异极显著( $P < 0.01$ ),原因主要

在于稀释液 1 提供给精子代谢的能源物质更有利于其吸收利用以及保持了适当的渗透压,所以精子活力和顶体完整率都保持了较高的水平。冻后的精子活力很低,以及稀释液 3 冻后的精子畸形率很高,这是否因为渗透压引起,还需进一步研究。甘油可以导致溶液在较低的温度下冻结,这样精子就可以进行足够慢的冷冻,以阻止大冰晶的形成,从而对精子起到保护作用<sup>[8]</sup>,但是,甘油浓度一定要合适<sup>[13]</sup>,过高或过低都会影响冷冻效果。如果甘油浓度过低,对精子没有起到完全的冷冻保护作用,使部分精子在冷冻过程中受到大冰晶的机械伤害,导致细胞膜破裂而死亡,从而导致冷冻保存的精子解冻后活力很低。反之甘油浓度过高,对精子产生毒害作用,导致解冻后精子的畸形率过高。

稀释液 1 在解冻后精子的活力、畸形率和顶体完整率虽然都与 TEST 稀释液差异不显著 ( $P > 0.05$ ),但是都略低于 TEST 稀释液。这主要是 TEST 稀释液是商品化的人 (*Homo sapiens*) 精子冷冻稀释液<sup>[10]</sup>,只是甘油调整为适合大熊猫的浓度,TEST 稀释液中的组分都是高度分析纯的物质,更有利于精子的吸收利用,同时各个组分的浓度都是经过大量重复实验最终确定的,而且是在无菌环境下配置而成。稀释液 1 中的组分都是普通分析纯物质,而且是在比较粗放的实验环境下配制而成,为了抑制环境中的有害细菌,稀释液 1 中加入了普通的药用青霉素和链霉素,而 TEST 中的双抗纯度很高,所以稀释液 1 中的双抗能保护精子免受外界环境中有害细菌的污染,但比 TEST 中的双抗对精子造成的伤害大。所有这些都可能是导致稀释液 1 解冻后的活力、畸形率和顶体完整率都略低于 TEST 稀释液的原因,所以稀释液 1 还有进一步完善的空间。TEST 稀释液国内没有生产、购买不方便,而且价格昂贵、保质期短,在  $-10^{\circ}\text{C}$  条件下保存期小于 2 年。由于大熊猫是季节性发情,每年一次,且发情期短,每年采精进行冷冻保存时,需提前订货购买 TEST 稀释液,给工作带来不便。冷冻保护稀释液是一个含有蛋白质的配方,容易受外界环境

的变化而变性。稀释液 1 最重要的优点是可以按照需要量现用现配,不用担心稀释液变性,同时,配制方法简便;但是,一定要把卵黄尽可能地粉碎。杨明海等在用自己配制的冷冻保存稀释液进行大熊猫精液冷冻保存 5 d 后,解冻观察,无论是解冻后加入冷冻稀释液稀释和没有稀释,精子都很快会死亡,可能是由于稀释液中的卵黄颗粒大,使精子运动受到限制,同时对精子造成机械损伤大,造成保存的精子很快死亡<sup>[14]</sup>。

目前在大熊猫的精液冷冻保存中都在使用 TEST 稀释液。本研究中 TEST 稀释液解冻后的精子活力低于侯蓉等<sup>[10]</sup>和黄炎等<sup>[5]</sup>的研究结果,顶体完整率低于黄炎等<sup>[5]</sup>的结果,但是高于侯蓉等<sup>[10]</sup>的研究结果。这些差异也可能与指名亚种和秦岭亚种间差异或人为操作以及实验环境差异有关。

**3.3 不同冷冻操作方法对秦岭大熊猫精液细管冷冻保存的影响** 采用方法 1 进行细管冻存秦岭大熊猫精液,解冻后精子活力和顶体完整率都明显高于方法 2,差异极显著 ( $P < 0.01$ ),而畸形率明显低于方法 2,差异极显著 ( $P < 0.01$ )。造成这种差异,是由于方法 1 的操作步骤少,加完保护液后,直接放入  $4^{\circ}\text{C}$  的冰箱中进行平衡,避免了方法 2 中逐步降温平衡过程中人为操作和实验室环境等因素等对冷冻效果所产生的影响。

目前,在黑熊 (*Selenarctos thibetanus*) 的精液冷冻保存过程中采用了自动冷冻法,解冻后精子活力和顶体完整率都显著高于两步冷冻法,而畸形率明显低于两步冷冻法<sup>[15]</sup>。虽然方法 1 效果明显好于方法 2,但是人为操作因素还存在,为了最大程度降低人为操作带来的实验误差,今后在秦岭大熊猫精液冷冻保存方面将尝试采用自动冷冻法。

**致谢** 陕西省珍稀野生动物抢救饲养研究中心的领导、科研人员及饲养员给本实验研究工作提供了大力支持和帮助,在此一并致谢!

## 参 考 文 献

- [1] Wan Q H, Wu H, Fang S G. A new subspecies of giant

- panda (*Ailuropoda melanoleuca*) from Shaanxi, China. *Journal of Mammalogy*, 2005, 86(2): 397 - 402.
- [ 2 ] 孙承骞,张哲邻,金学林. 秦岭大熊猫局域种群的划分及数量分布. *陕西师范大学学报:自然科学版*, 2006, 34(1): 163 - 167.
- [ 3 ] 金学林. 秦岭大熊猫的保护现状及易地保护研究. *西北大学学报:自然科学版*, 2008, 38(2): 248 - 252.
- [ 4 ] 胡锦矗,张泽钧,魏辅文. 中国大熊猫保护区发展历史、现状及前瞻. *兽类学报*, 2011, 31(1): 10 - 14.
- [ 5 ] 黄炎,李德生,张和民,等. 大熊猫电刺激采精及精液冷冻保存研究. *四川师范学院学报:自然科学版*, 2000, 21(3): 238 - 243.
- [ 6 ] 黄炎,李德生,张和民,等. 使用冷藏精液进行大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 人工授精. *应用与环境生物学报*, 2001, 7(6): 558 - 562.
- [ 7 ] 陈丽梅,侯蓉,张美佳,等. 亚洲黑熊电刺激采精及精液品质分析. *黑龙江畜牧兽医*, 2002, (2): 1 - 3.
- [ 8 ] 桑润滋. *动物繁殖生物技术*. 2 版. 北京:中国农业出版社, 2006: 204 - 247.
- [ 9 ] 耿孝媛,吴晓民,车利锋,等. 北极狐、乌苏里貉精液细管冷冻技术研究. *经济动物学报*, 2005, 9(4): 198 - 200.
- [ 10 ] 侯蓉,王基山,张志和,等. 大熊猫细管冻精制备程序的建立与应用. *中国兽医学报*, 2005, 25(3): 320 - 322.
- [ 11 ] 周应敏,李德生,王鹏彦,等. 大熊猫精液品质评价方法. *动物医学进展*, 2008, 29(1): 104 - 106.
- [ 12 ] Pope C E, Zhang Y Z, Dresser B L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 1991, 22(1): 87 - 95.
- [ 13 ] 黄炎,李德生,杜军,等. 大熊猫精液超低温冷冻的比较. *动物学杂志*, 2001, 36(2): 25 - 29.
- [ 14 ] 杨明海,彭真信,罗义,等. 大熊猫细管精液冷冻保存简易方法初探. *中国畜牧杂志*, 1999, 35(5): 37.
- [ 15 ] 刘伟,刘京子,张星吉,等. 圈养黑熊精液的冷冻保存. *兽类学报*, 2009, 29(1): 63 - 68.