

种公鸡精液稀释液的研究

采克俊¹, 刘莉^{1*}, 张易祥¹, 高云², 严俊², 陈秋明²

(1. 湖州师范学院生命科学学院, 浙江湖州 313000; 2. 湖州广东温氏畜牧有限公司, 浙江湖州 313022)

摘要 种公鸡精液稀释与人工授精技术相结合, 可以提高种公鸡的利用率, 降低饲养成本, 增加经济效益。就影响鸡精液稀释保存效果的相关因素, 如稀释液物质组成、pH 值、渗透压、稀释比例、稀释操作、输精频率等作一综述。

关键词 鸡; 精液; 稀释液; 人工授精

中图分类号 S831 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)26-11336-02

Study on Breeder Cock Semen Extender

CAI Ke-jun et al (College of Life Sciences, Huzhou Teachers College, Huzhou, Zhejiang 313000)

Abstract The combination of semen dilution and artificial insemination in breeder cocks could improve the reproductive efficiency of cock, reduce feeding cost and thus enhance economic efficiency. Related factors influencing the storage effect of fowl semen dilution were reviewed including the composition of diluents, pH value, osmotic pressure, dilution rates, dilution manipulation and frequency of insemination.

Key words Chicken; Semen; Extender; Artificial insemination

鸡的人工授精技术不仅显著提高了母鸡种蛋的受精率, 也极大地降低了生产成本。由于母鸡数量大, 输精频率高, 且公鸡的采精量少, 精子密度高, 因此精液需要稀释。精液稀释后, 能使精子均匀分布, 精液量增加, 保证每次输精有足够剂量的精子, 便于给更多母鸡输精, 从而提高公鸡的利用率, 减少饲养成本, 增加经济效益。同时精液只有经稀释处理后, 才能进行有效的保存和运输^[1]。笔者就影响鸡精液稀释保存效果的相关因素, 如稀释液物质组成、pH 值、渗透压、稀释比例、稀释操作、输精频率等作一综述, 以期指导制备高受精率的鸡精液稀释液, 促进现代养鸡业的发展。

1 稀释液物质组成

当鸡精液稀释后, 精子的运动度、ATP 利用、气体交换、离子平衡等都会受到稀释液成分和稀释比例的影响, 尤其是高倍稀释时^[2]。稀释液保存效果与稀释液物质组成密切相关。组成最简单的稀释液为生理盐水和浓度 5.7% 葡萄糖, 而复杂的稀释液则成分较多, 复方稀释液保存效果普遍优于单方稀释液^[3]。常用鸡精液稀释液的成分见表 1。资料表明, 在家禽稀释液中果糖优于葡萄糖, 并证实精子分解葡萄糖的速度很快, 而分解果糖较慢, 故对精子的有害酸性程度就非常轻微^[5-6]。张兆旺将三种糖(葡萄糖、蔗糖、果糖)在 3~5℃ 下进行精液保存试验, 结果表明, 果糖稀释液中精子生存指数、存活时间和畸形率优于蔗糖, 葡萄糖效果最差^[7]。谷氨酸钠对精子有保护作用, 在葡萄糖-磷酸盐类鸡精液稀释液中, 添加谷氨酸钠优于柠檬酸钠, 柠檬酸钠又优于氯化钾; 谷氨酸钠在单独配制稀释液时以每 100 ml 含 2.40~2.47 g 为宜^[5-7]。另外, 适量的 K⁺、Mg²⁺ 对鸡精子的寿命有延长作用^[5-6]。少量的 K⁺ 是维持精子正常机能所必需的; Mg²⁺ 具有保护精子运动和延长其寿命的功能。在鸡精液稀释液中加入青霉素、链霉素, 可以大大减少种鸡输卵管囊膜炎的发病率, 对提高种蛋受精率和种鸡产蛋率有显著作用^[5]。

表 1 常用鸡精液稀释液的成分^[4]

Table 1 The composition of some common chick semen extender

成分 Component	g/100 ml			
	BPSE	BNPr-2	Lake 液 Lake liquid	Brown 液 Brown liquid
葡萄糖 Glucose		0.060		0.500
果糖 Fructose	0.500		1.000	
棉子糖 Raffinose				0.380
肌醇 Myoinositol				0.220
谷氨酸钠 Sodium glutamate	0.876		1.920	0.234
醋酸钠 Sodium acetate	0.430		0.857	
柠檬酸钠 Sodium citrate	0.064		0.128	0.321
柠檬酸 Citric acid				0.039
KCl		0.175		
CaCl ₂		0.048		0.010
NaCl		0.068		
KH ₂ PO ₄	0.065			
K ₂ HPO ₄	1.270			
TES	0.195			2.230
MnCl ₂		0.100		
Na ₂ CO ₃		0.025		

注: TES 为 N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙磺酸。

Note: TES = N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]-2-aminoethanesulfonic acid.

2 影响鸡精液保存效果的相关因素

2.1 渗透压 渗透压是鸡精液稀释液的重要参数之一。鸡精液的渗透压一般为 330~420 mOsm/kg, 也有测定结果为 295~360 mOsm/kg^[3], 张兆旺等测定了鸡精液的渗透压值为 347 mOsm/kg^[6]。理论上, 稀释液与精液等渗时, 精子形态正常, 适于精子生存。黄美玉等用 267、368、567 mOsm/kg 3 种不同渗透压稀释的精液输精, 结果 368 mOsm/kg 组种蛋受精率显著高于其他两组。同时发现, 在 30℃ 保存条件下, 随着稀释液渗透压的升高或降低, 精子生存指数下降, 而与鸡精液渗透压相近的稀释液中精子活力较好, 存活时间较长^[8]。

张兆旺等筛选出的 3 个优等稀释液的渗透压在 352~362 mOsm/kg, 3 个良等稀释液的渗透压在 304~385 mOsm/kg, 认为稀释液以等渗时为最好。同时还发现, 在 516~576 mOsm/kg 的高渗环境中, 鸡精子会出现“暂时性休克”

基金项目 国家自然科学基金(30500270); 浙江省科技攻关重点计划项目(2005C22052); 湖州市人事局新农村建设项目。

作者简介 采克俊(1975-), 男, 安徽滁州人, 博士, 副教授, 从事生殖生物学研究。*通讯作者, E-mail: liuli6655@hute.zj.cn。

收稿日期 2008-06-30

现象,即刚稀释后,观察活力为零,随着时间的延长,活力逐渐回升,但精子生存指数较低,说明鸡精子对高渗环境的适应需要一定时间,且适应能力很有限^[9]。张兆旺还观察到渗透压值与精子头部畸形类型高度相关,与精子头部弯曲且膨胀百分数相关系数为-0.93,与精子头部单纯弯曲百分数的相关系数为0.94^[7]。

精液稀释液最佳的渗透压可能不是一个定值,而是因稀释液的成分不同而有变化,如蔗糖和谷氨酸钠在鸡精液稀释液中也具有延长精子寿命的特殊作用,可以部分地缓解低渗透压的不良影响^[6]。杨保田等观察到等渗环境下精子在柠檬酸钠溶液中的生存指数较在葡萄糖、蔗糖和氯化钠溶液中要高,在稀释液溶质相同的条件下,较低渗透压的精子活力和生存指数极显著高于较高渗透压,其畸形率显著低于较高渗透压^[10]。

2.2 pH 值 由于鸡精子代谢很强烈,能量消耗快,同时因代谢产物的积累,改变了pH值,导致某些酶的活性被抑制,致使精子丧失受精能力,因此稀释液pH值很重要^[5]。欲使鸡精液保存效果好,稀释液的pH值应与其生理范围尽量靠近(6.8~7.2)^[3,7]。因精子代谢过程中产生的一些物质使pH值发生偏离,会对精子产生不利影响,只有使精细胞处在一个相对稳定的、适宜的环境中,其代谢才能正常进行。因此,鸡精液稀释液缓冲体系的存在是必不可少的。成分全面且缓冲能力强的稀释液有利于精子活力的维持^[3,11]。

为了最大限度地保存精子活率,国外学者还提出用两步稀释法,即先用pH为6.5的磷酸盐缓冲液稀释鸡精液,以抑制其新陈代谢,授精时再用pH为7.5的磷酸盐缓冲液第2次稀释,以激活精子的运动度^[12]。不过,这样操作很不方便,缺乏实用性。

2.3 稀释比例 精液稀释的最主要目的是增加精液量,稀释比例越高,精液量增加得越多,种公鸡利用率越高。但随着稀释倍数的提高,精液中营养保护成分的浓度和精子浓度也随之下降。因此,过高比例的稀释会降低受精率。胡松庭等对鸡精液进行1:1、1:2和1:3稀释,结果稀释比例为1:1和1:2时,种蛋受精率差异不显著,其中1:1稀释组效果最佳,显著高于1:3稀释处理组^[13]。尹华贵以1% NaCl和5.7%葡萄糖为稀释液,研究不同稀释比、输精量对川牧土鸡受精率、孵化率的回归程度。结果表明,1% NaCl以1:1稀释,每次输100 μ l,6 d输精1次,效果最佳^[14]。简仿辉等用Lake氏液以1:1比例对优质麻羽肉用种公鸡的精液进行稀释,稀释后不经保存进行输精,将试验组的输精量(稀释后)分别确定为30、40、50 μ l,而对照组原精液输30 μ l,输精量为30 μ l的试验组种蛋受精率显著降低,这可能是由于输精的总精子数过少引起的^[15]。目前生产上常采用1:1~1:3稀释,5~7 d输精1次,每只母鸡每次输稀释后的精液100 μ l。

2.4 稀释操作 种公鸡精液的稀释要遵循以下原则:一是等温稀释,就是要把稀释液的温度调节到与精液相等,最多相差不能超过2 $^{\circ}$ C,否则,精子成活率将受到不良影响,温差过大,还会导致对精子的“低温打击”,精子的结构和功能将受到很大损伤;二是及时稀释,就是采完精液后立即进行稀释,尽可能缩短原精液离体放置的时间,因为原精液精子密

度大,一遇到氧气,代谢加剧,而原精液中能源物质很少,缓冲体系能力有限,精子会因能源枯竭和代谢产物堆积的毒性而丧失受精能力;三是按将稀释液加入精液的方向稀释,因为精子有一种生理特性,就是当一次稀释比例过大时,会导致精子休克而丧失受精能力。如果错误地把精液加入稀释液,则最初的几滴精液中的精子就会受到“稀释打击”。若按要求把稀释液加入精液,最初加入的稀释液对精子而言,稀释比例尚很小,几乎不会对精子造成大的损伤,所以是安全的^[16]。

2.5 输精频率 无论自然交配或人工授精,鸡精子会很快沿输卵管上行并到达输卵管子宫-阴道交界处的储精腺(Sperm-host gland)内,精子能在此生存24 d之久,并具有受精能力。这主要是因为输卵管液中含有丰富的蛋白质、糖类、电解质及水等物,输卵管上皮细胞还以其顶部质膜唾液酸化的多糖-蛋白复合物暂时黏附精子头部,在此处形成精子库,不仅确保了适当条件下有一定数量的精子到达受精部位,而且还有益于精子获得营养,排除积累的代谢废物,而保持受精力。因此,人工授精后受精能力持续时间依赖于输入精子库的精子数量,数量愈多,受精持续时间愈久^[17-19]。

除此之外,精液中本身含有很多保护物质,如 V_C 、 V_E 、Se-GSH-Px、谷胱甘肽等,能防止鸡精子质膜的脂质过氧化,从而阻止精子衰老死亡^[20-21]。但精液稀释后,这些抗氧化剂浓度大大降低,保护作用微乎其微。如果在稀释液中添加维生素、过氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化剂可以抑制脂质过氧化反应,增强稀释液的保存效果,就可能延长精子的寿命,从而延长输精间隔天数。这将大大降低劳动强度和生产成本。

目前,国内使用的稀释液成分极为简单,多为生理盐水、葡萄糖注射液、味精溶液等,不能对精子进行充分保护,且稀释后必须立即输精,输精间隔只能达到4~7 d^[1]。在一些发达国家已经开始研究新型稀释液,即通过添加特殊成分以延长精子存活时间,使鸡人工授精的输精间隔达到12~14 d而不降低受精率^[4]。

3 展望

虽然国内许多单位和学者对鸡精液及稀释液进行了相关研究,取得了一定的进展,但研究缺乏系统性,又由于所研究鸡的品种、饲料配比、饲养环境等方面的差异,鸡的精液特性也有所不同,研制出的稀释液使用时效果并不理想。如何根据不同品种鸡精液和精子的生理特性和在输卵管中的存贮规律,研制出相应的有效可靠,且价格低廉、易于推广应用的新型高效的种公鸡精液稀释液,还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] 韩雪峰,刘福柱,杨长锁. 公鸡精液稀释液的研究进展[J]. 甘肃畜牧兽医,2003(6):40-43.
- [2] PARKER H M, MCDANIEL C D. The immediate impact of semen diluent and rate of dilution on the sperm quality index, ATP utilization, gas exchange, and ionic balance of broiler breeder sperm[J]. Poultry Sci, 2006, 85(1):106-116.
- [3] 张兆旺,刘丽霞. 稀释液溶质、渗透压、pH值和缓冲指数与低温保存鸡精液效果的关系[J]. 中国家禽,2004,26(21):13-16.
- [4] 牛岩,郭良星. 家禽人工授精技术[M]. 郑州:河南科学技术出版社,2003.
- [5] 权凯,黄炎坤. 鸡精液稀释液研究进展[J]. 养禽与禽病防治,2006(2):4-6.
- [6] 张兆旺,姚希芳. 影响鸡精液37 $^{\circ}$ C下保存效果的因素[J]. 中国家禽,2002,24(13):23-23.

2.2 药物对种蛋合格率的影响 每组每天可以用于孵化的种蛋数与该组的产蛋总数相除即为种蛋合格率。

由表 2 可见,使用不同剂量溴隐停 2 周后试验组的种蛋合格率较低,但各组的种蛋合格率没有明显差别,说明这种药物对麻羽肉种鸡的种蛋合格率影响不大。

2.3 药物对破蛋率的影响 破蛋主要是指蛋壳表面有破孔或有破裂,这样的蛋不能用于孵化,其商品价值也比较低。由表 3 可见,2 周内的平均破蛋率以试验 3 组最高,极显著地 ($P < 0.01$) 高于对照组,并且使用药物处理后的试验组 2 周平均破蛋率都要高于对照组。

表 2 药物对种蛋合格率的影响

组别	处理后第 1 周种蛋合格率	处理后第 2 周种蛋合格率	2 周平均种蛋合格率
Group	Qualified rate in first week after treatment	Qualified rate in second week after treatment	Average qualified rate in two weeks
试验 1 组 Test group 1	73.9	90.0	81.95
试验 2 组 Test group 2	74.4	84.1	79.25
试验 3 组 Test group 3	61.9	84.9	73.40
对照组 Control group	82.6	85.0	83.80

表 3 药物对破蛋率的影响

组别	处理后第 1 周破蛋率	处理后第 2 周破蛋率	2 周平均破蛋率
Group	Broken egg rate in first week after treatment	Broken egg rate in second week after treatment	Broken egg rate in two weeks
试验 1 组 Test group 1	8.6	3.1	5.85
试验 2 组 Test group 2	6.4	6.4	6.40
试验 3 组 Test group 3	11.1	2.4	6.75
对照组 Control group	5.2	4.3	4.75

3 讨论

试验结果表明,使用溴隐停处理的鸡群 2 周内的产蛋率差别很不明显,这个结果与方第安等^[3]研究一致:使用多巴胺受体激动剂后不能有效提高鸡和鹅的产蛋性能。黄炎坤等报道利用溴隐停处理黄羽肉鸡可以提高其产蛋性能的研究结果^[5],与该试验结果存在不一致。

试验中使用溴隐停处理的 3 个试验鸡群的畸形蛋率均高于对照组。而影响种蛋合格率的主要指标是蛋的畸形率、破损率等,这些因素往往与母鸡输卵管的功能是否正常有很大关系,但使用溴隐停是否损伤母鸡输卵管的机能及其机理

仍需要进一步研究。

参考文献

(上接第 11337 页)

- [1] 黄炎坤,王娟娟,张贺军.两种多巴胺受体激动剂对黄羽肉种鸡产蛋性能的影响[J].安徽农业科学,2007,35(9):9251-9252.
- [2] 黄炎坤,韩占兵,王娟娟,等.氯丙嗪和赛庚啉对黄羽肉种鸡产蛋性能的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2008(1):35-36.
- [3] 方第安,耿照玉,章孝荣,等.下丘脑多巴胺和 5-羟色胺调空皖西白鹅就巢机理的研究[J].中国畜牧兽医,2005,32(7):35-37.
- [4] 施振旦,梁少东,毕英佐.下丘脑多巴胺和 5-羟色胺调空鸡就巢机理的研究[J].畜牧兽医学报,2000,31(6):487-492.
- [5] 黄炎坤,赵金燕,范佳英,等.溴隐停和克罗米芬处理就巢鸡的效果研究[J].西北农林科技大学学报,2006,34(1):105-107.
- [6] 简仿辉,张守全.稀释后的种公鸡精液对种蛋受精率和孵化率的影响[J].养禽与禽病防治,2000(11):16-17.
- [7] 张兆旺.稀释液溶质和渗透压对鸡精子体外存活及形态的影响[J].中国家禽,2001,23(8):50-52.
- [8] 黄美玉,陈元明.不同渗透压稀释液对鸡精子存活率和授精率的影响[J].中国家禽,1989(2):26-28.
- [9] 张兆旺,张进邦.鸡精液稀释液筛选试验[J].甘肃农业大学学报,1992,27(4):333-338.
- [10] 杨保田,牛盛模.稀释液溶质及渗透压对鸡精液低温保存效果的影响[J].甘肃畜牧兽医,2006(6):21-22.
- [11] 张兆旺.鸡精液稀释液设计与筛选方法学研究[D].兰州:甘肃农业大学,2005.
- [12] AMEHA N,MOUDGAL R,ASMARE A. Development of two stages cocks semen extender for room temperature storage at laboratory[J]. The Journal of Poultry Science,2007,44:78-84.
- [13] 胡松庭,王宝维,李焕玲,等.鸡高效精液稀释液对种蛋受精率影响的研究[J].莱阳农学院学报,1994,11(3):214-217.
- [14] 尹华贵.稀释比、输精量及间隔时间对川牧土鸡人工授精的影响[J].畜牧与兽医,2002,34(12):20-21.
- [15] 简仿辉,张守全.稀释后的种公鸡精液对种蛋受精率和孵化率的影响[J].养禽与禽病防治,2000(11):16-17.
- [16] 张兆旺.如何做好鸡的稀释精液人工授精[J].中国家禽,2004,26(11):20-21.
- [17] BAKST M R, WISHART G, BRILLARD J P. Oviductal sperm selection, transport, and storage in poultry[J]. Poult Sci Rev,1994,5:117-143.
- [18] FROMAN D. Deduction of a model for sperm storage in the oviduct of the domestic fowl (*Gallus domesticus*) [J]. Biol Reprod,2003,69(1):248-253.
- [19] DAS S K. Evidence for the innervation of sperm-host glands (SHG) of native chicken's (*Gallus domesticus*) oviduct [J]. Intern J Poult Sci,2003,2(4):259-260.
- [20] BREQUE C, SURAI P, BRILLARD J P. Antioxidant status of the lower oviduct in the chicken varies with age and dietary vitamin E supplementation[J]. Mol Reprod Dev,2006,73(8):1045-1051.
- [21] BREQUE C, SURAI P, BRILLARD J P. Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro[J]. Mol Reprod Dev,2003,66(3):314-323.