

奶牛性控冻精人工授精效果的研究

马毅¹, 陈小强², 贾福德¹, 田雨泽¹, 张聚忠¹, 朱芳贤¹, 赵庆斌¹, 汪连海¹

(1. 天津市奶牛发展中心, 天津 300384; 2. 天津农学院, 天津 300384)

摘要:为研究奶牛性控冻精人工授精效果并合理制定人工授精方案,采用流式细胞仪制备性控冻精,对3 947头健康荷斯坦牛进行人工授精。结果表明:性控冻精和常规冻精的受胎率、产犊率差异不显著($P > 0.05$),但性控冻精的雌犊率和繁殖率分别达到92.01%和50.03%,对照组仅为51.13%和34.97%,差异极显著($P < 0.01$)。青年牛的情期受胎率达到55.25%,极显著高于经产牛($P < 0.01$);青年牛的产犊率达到98.31%,显著高于经产牛($P < 0.05$);青年牛的繁殖率为51.84%,经产牛为42.12%,存在极显著差异($P < 0.01$)。采用第1次人工授精后10~11 h重复授精1次,每次1支性控冻精的授精方案,其情期受胎率为55.17%,繁殖率达到55.81%,同其他方案相比,差异极显著($P < 0.01$)。应用性控冻精进行人工授精可以显著提高母牛的繁殖效率。

关键词:奶牛;性别控制;冷冻精液;人工授精

中图分类号: S814.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2010)01-0113-04

Effect of Artificial Insemination with Frozen-sexed Sperm on the Reproduction of Dairy Cow

MA Yi¹, CHEN Xiao-qiang², JIA Fu-de¹, TIAN Yu-ze¹, ZHANG Ju-zhong¹, ZHU Fang-xian¹, ZHAO Qing-bin¹, WANG Lian-hai¹

(1. Tianjin Dairy Cattle Development Center, Tianjin 300384, China; 2. Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)

Abstract: To evaluate the effect of artificial insemination with frozen-sexed sperm on the reproductive performance of dairy cow, and to further improve insemination strategies, frozen sperm was sexed by flow cytometry. Then 3 947 health Holstein cow were artificially inseminated with frozen sperm unsexed or sexed. The results showed: The pregnancy and calving rates were 48.91% and 97.97% for sexed-sperm AIs, 51.74% and 98.05% for the unsexed-sperm AIs ($P > 0.05$). The proportion of female calves derived from sexed-sperm AIs was 92.01% compared with 51.13% for control AIs ($P < 0.01$), the reproductive rate was 51.13% for sexed-sperm AIs and 34.97% for control AIs ($P < 0.01$). The pregnancy rate was 55.25% for primiparous cow and was obviously higher than that of multiparous cow ($P < 0.01$), the calving rate was 98.31% for primiparous cow and was higher than that of multiparous cow ($P < 0.05$), the reproductive rates was 51.84% for primiparous cow and 42.12% for multiparous cow, there were significant differences ($P < 0.01$). When a insemination was followed by a second one 10—11 hours later, and a single-doses sperm was used in each time, the pregnancy and reproductive rates were both the highest ($P < 0.01$). Our results indicated that AI using sexed sperm under field conditions in commercial dairy herds without oestrus synchronization resulted in a significantly improvement of reproductive effect compared with AI using unsexed sperm.

Key words: Dairy cow; Sex control; Frozen sperm; Artificial insemination

性别控制技术对奶牛业的发展具有重要意义。目前,根据X、Y精子在DNA含量等方面的差异,应用流式细胞仪制备性控冻精已成为奶牛性别控制的重要途径^[1]。该方法可以最大限度地发挥良种奶

收稿日期: 2009-09-10

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAD04A01-11; 2006BAD04A01-21); 天津市自然科学基金项目(08JCYBJC04500); 天津市农业科技成果转化与推广项目(0603010)

作者简介: 马毅(1976-),男,天津人,副研究员,主要从事动物生物技术研究。

牛的遗传与繁殖潜力,增加遗传选择强度,加快育种进展,提高良种牛繁育速度。在早期研究中,应用流式细胞仪制备的性控冻精,其人工授精效果要低于常规精液^[2-4],使性控冻精的推广受到影响。但随着细胞生物学等学科的发展,性控冻精的生产工艺不断改进,为此,开展了奶牛性控冻精人工授精效果的研究。本研究旨在对精子密度、活率等指标相同的性控冻精与非性控冻精之人工授精效果进行比较,并对影响性控冻精人工授精效果的牛只类型等因素进行分析,以便为制定性控冻精的合理授精方案,促进性控精液的广泛应用提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 冷冻精液

选取天津市奶牛发展中心饲养的5头优秀荷斯坦公牛,采集精液后进行Hoechst 33342染色,并应用MoFb高速流式细胞分选仪分离,选取X精子部分以0.25 mL细管分装,精子数 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$,解冻后活率0.4~0.5。来源于相同种公牛的常规冷冻精液作为对照,规格为0.25 mL细管,精子数 1×10^7 ,解冻后活率0.4~0.5。

1.2 人工授精

人工授精自2006年11月24日开始至2007年2月30日结束。选取健康无生殖疾病、营养均衡、体况适中的荷斯坦青年牛2982头(15~18月龄,体重370 kg以上)和经产荷斯坦牛965头(27~72月龄,体重550 kg以上)作为参配母牛。试验分布于天津市的26个牛场进行。共使用性控冷冻精液3392支,非性控冷冻精液4725支。

受配母牛出现食欲不振、精神不安、尿频、乳量减少、流白色半透明粘液、拱背等症状,接受爬跨后

判定为发情,并经直肠检查,卵巢上出现明显卵泡的牛只采用直肠把握法进行人工授精。授精时,将冷冻精液从液氮中取出后立即置于38℃水浴中15 s解冻,然后对参配母牛进行人工授精。

性控冷冻精液随机采用以下3种方案进行人工授精:方案1:受配母牛出现发情症状后10~11 h进行1次人工授精,使用1支性控冻精;方案2:受配母牛出现发情症状后10~11 h进行1次人工授精,同时使用2支性控冻精;方案3:受配母牛出现发情症状后10~11 h进行第1次人工授精,间隔10~11 h重复授精1次,每次使用1支性控冻精。

1.3 妊娠检查

用直肠检查法对输精后60 d的参配母牛进行妊娠检查,确定受胎情况。

1.4 数据分析

本研究中繁殖率被定义为出生母犊数与参配母牛数的比率,即:繁殖率=出生母犊数/参配母牛数,结果以统计分析软件SPSSV14.0进行²检验。 $P < 0.05$ 时为显著差异, $P < 0.01$ 时为极显著差异。

2 结果与分析

2.1 性控精液与常规精液人工授精效果的比较
在相同饲养条件下,比较性控冷冻精液与常规冷冻精液的人工授精效果,结果见表1。性控冻精和常规冻精的受胎率与产犊率差异不显著($P > 0.05$),其中性控冻精的受胎率为48.91%,产犊率为97.97%,稍低于常规精液的受胎率和产犊率。但性控冻精的雌犊率达到92.01%,常规精液的雌犊率则仅为51.13%,差异极显著($P < 0.01$)。

表1 性控冻精与常规冻精人工授精的效果比较

Tab 1 Comparison of the effect of artificial insemination with sexed or unsexed sperm					
精液类型 Sperm type	情期输精数 No. of AIs	情期受胎率/% Pregnancy rate	产犊率/% Calving rate	雌犊率/% Rate of female calves	繁殖效率/% Rate of reproduction
性控精液 Sexed sperm	2 012	48.91(984/2 012)	97.97(964/984)	92.01(887/964)**	50.03(887/1 773)**
非性控精液 Unsexed sperm	2 876	51.74(1 488/2 876)	98.05(1 459/1 488)	51.13(746/1 459)	34.97(746/2 174)*

注:*. $P < 0.05$; **. $P < 0.01$ 。下同。

2.2 参配母牛对人工授精效果的影响

性控冻精对青年牛人工授精的情期受胎率达到55.25%,极显著高于经产牛的30.56%($P < 0.01$)。产犊率达到了98.31%,也显著高于经产牛的96.20%($P < 0.05$)。对雌犊率而言,青年牛和经产牛并不存在显著差异($P > 0.05$),但青年牛的繁殖率极显著高于经产牛($P < 0.01$) (表2)。这表明,应用性控冻精对青年牛进行人工授精的效果要优于

经产牛。

2.3 不同授精方案对人工授精效果的影响

性控冻精3种人工授精方案的效果并不相同,结果见表3。其中,方案3的情期受胎率达到了55.17%,繁殖率达到55.81%,与方案1及方案2的效果均存在极显著差异($P < 0.01$)。结果表明,就情期受胎率及繁殖率而言,情期输精2次,每次1支性控冻精的人工授精效果要优于情期输精1次、1

支性控冻精或输精 1 次、2 支性控冻精的人工授精。

表 2 性控精液对不同母牛人工授精的效果比较

Tab 2 Comparson of the effect of A I with multiparous or prin iparous cow					
牛只类型	输精情期数	情期受胎率 / %	产犊率 / %	雌犊率 / %	繁殖率 / %
Cow type	No. of A Is	Pregnancy rate	Calving rate	Rat of female calves	Rate of reproduction
青年牛 Primiparous cow	1 495	55. 25 (826/1 495) **	98. 31 (812/826) *	92. 12 (748/812)	51. 84 (748/1 443) **
经产牛 Multiparous cow	517	30. 56 (158/517)	96. 20 (152/158)	91. 45 (139/152)	42. 12 (139/330)

表 3 性控精液不同人工授精方案的效果比较

Tab 3 Comparson of the effect of A I with different procedure					
Procedure of A I	输精情期数	情期受胎率 / %	产犊率 / %	雌犊率 / %	繁殖率 / %
	No. of A Is	Pregnancy rate	Calving rate	Rat of female calves	Rate of reproduction
方案 1 Procedure1	632	45. 57 (288/632) a	96. 88 (279/288) a	91. 04 (254/279) a	43. 72 (254/581) a
方案 2 Procedure2	693	47. 91 (332/693) b	97. 59 (324/332) a	91. 67 (297/324) a	50. 34 (297/590) b
方案 3 Procedure3	687	55. 17 (379/687) c	95. 25 (361/379) a	93. 07 (336/361) a	55. 81 (336/602) c

注: 同列数据后所标字母相异表示差异显著 ($P < 0. 05$), 所标字母相同表示差异不显著 ($P > 0. 05$)。
Note: Different letters in the same column means significant difference between the treatments ($P < 0. 05$), same letter in the same column means not significant difference between treatments ($P > 0. 05$).

3 讨论

目前,对奶牛进行控制性别主要采用 X、Y 精子分离法。由于 X 与 Y 精子之间在 DNA 含量等方面存在着微弱的生物学差异,这就为 X、Y 精子的分离提供了依据^[1]。目前已设计出了许多分离精子的方法,如沉降法、电泳法、离心法、免疫法、流式细胞法等。其中,最具潜力、应用前景最广的便是流式细胞仪分离法。该方法对犊牛性别控制的准确率可以达到 90% 左右^[5]。在本研究中,使用性控冻精后的雌犊率达到 92. 01%,繁殖率达到 50. 03%,同上述研究结果相类似,证实了利用流式细胞仪分离法制备的性控冻精可以相对有效地控制犊牛性别,并因此显著提高母牛繁殖效率。

另一方面,有学者认为,应用流式细胞仪制备的性控精液,其受胎率及产犊率要低于常规精液^[2,3]。诚然,在流式细胞仪对 X、Y 精子进行分离的过程中,精子需要经历多个环节的处理,包括高倍稀释、核染色、机械损伤、紫外线照射等,这些环节将会影响精子质量^[6]。迄今为止,利用流式细胞仪制备的性控精液已被应用于多种动物,特别是在牛上,已有很多后代产生,在这些后代牛中没有出现表型异常的报道^[7-10]。这表明流式细胞仪在分离精子的过程中,精子的遗传物质并没有受到严重伤害。在早期的研究中,性控冻精的每次授精量低于对照组^[4],而低授精量可以导致受胎率的显著下降^[9,11],这些结论受到 Den 等^[12]的支持。这提示,应用性控精液后的较低受胎率主要是低授精量所致,因此,通过增加授精量可提高性控精液的受胎率及产犊率。Schenk 等^[13]的研究证实,增加性控精液的有效精子数后获得可移胚的数量同常规精液组相似。本研究

中性控精液的受胎率为 48. 91%,产犊率为 97. 97%,仅稍低于非性控冻精的受胎率 51. 74%和产犊率 98. 05%,但差异不显著 ($P > 0. 05$)。这表明,合理的授精量可以提高性控冻精的受胎率及产犊率。

人工授精效果受参配母牛胎次等多种因素的影响^[14,15]。本研究发现,当参配母牛为青年牛时,性控冻精的情期受胎率达到了 55. 25%,产犊率达到了 98. 31%,繁殖率达到 51. 84%,均显著高于经产牛的各项指标。这表明参配母牛影响人工授精的效果,而青年牛人工授精的效果要显著优于经产牛。

本研究还发现,当受配母牛出现发情症状后 10 ~ 11 h 进行第 1 次人工授精,间隔 10 ~ 11 h 重复授精 1 次时,性控冻精的受胎率为 55. 17%,繁殖率为 55. 81%,均显著高于其他方案。这表明授精方案能够影响性控冻精的人工授精效果。因此,为进一步提高性控冻精的人工授精效果,必须综合考虑参配母牛的生理状况,合理设计授精方案。

参考文献:

[1] Johnson L A, Welch G R, Rens W. The beltsville sperm-sexing technology: High-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI[J]. J Anim Sci, 1999, 77 (Suppl 2): 213 - 220.
[2] Seidel G E Jr, Schenk J L, Herickhoff L A, et al. Insemination of heifers with sexed spermatozoa[J]. Theriogenology, 1999, 52 (8): 1407 - 1420.
[3] Buchanan B R, Seidel G E Jr, McCue P M, et al. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa[J]. Theriogenology, 2000, 53 (6): 1333 - 1344.
[4] Seidel G E Jr, Gamet D L. Current status of sexing mammalian spermatozoa[J]. Reproduction, 2002, 124 (6): 733

- 743.
- [5] Tubman L M, Brink Z, Suh T K, *et al* Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting[J]. *J Anim Sci*, 2004, 82(4): 1029 - 1036
- [6] Maxwell W M, Johnson L A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma [J]. *Theriogenology*, 1999, 52(8): 1353 - 1362
- [7] Morrell J M, Dresser D W. Offspring from insemination with mammalian sperm stained with Hoechst 33342, either with or without flow cytometry [J]. *Mutation Research*, 1989, 224(2): 177 - 189.
- [8] Johnson L A, Welch G R, Keyvanfar K, *et al* Gender preselection in humans? Flow cytometric separation of X and Y spermatozoa for the prevention of X-linked diseases [J]. *Human Reproduction*, 1993, 8(10): 1733 - 1739.
- [9] Doyle S P, Seidel G E Jr, Schenk J L, *et al* Artificial insemination of lactating Angus cows with sexed semen [M]//American Society of Animal Science Proceedings Provo, Utah: American Society of Animal Science, 1999: 203 - 205.
- [10] Fugger E F. Clinical experience with flow cytometric separation of human X-and Y-chromosome bearing sperm [J]. *Theriogenology*, 1999, 52(8): 1345 - 1440.
- [11] Andersson M, Taponen J, Koskinen E, *et al* Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows [J]. *Theriogenology*, 2004, 61(7 - 8): 1583 - 1588.
- [12] Den Daas J H, De Jong G, Lansbergen L M, *et al* The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls [J]. *J Dairy Sci*, 1998, 81(6): 1714 - 1723.
- [13] Schenk J L, Suh T K, Seidel G E Jr. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm [J]. *Theriogenology*, 2006, 65(2): 299 - 307.
- [14] Garcia-Ispuerto I, Lopez-Gatius F, Santolaria P, *et al* Factors affecting the fertility of high producing dairy herds in northeastern Spain [J]. *Theriogenology*, 2007, 67(3): 632 - 638.
- [15] Caraviell D Z, Weigel K A, Fricke P M, *et al* Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms [J]. *J Dairy Sci*, 2006, 89(12): 4723 - 4735.