



大家畜 冷冻精液 授精技术

甘肃科学技术出版社

14.3
32 冊

大家畜冷冻精液授精技术

曹 礼 毛广平 编

甘肃科学技术出版社

责任编辑：康克仁

封面设计：一帆

大家畜冷冻精液授精技术

曹礼毛广平编

甘肃科学技术出版社出版

（兰州第一新村81号）

甘肃省新华书店发行 兰州新华印刷厂印刷

开本787×1092毫米1/32 印张5.25 字数105,000

1988年3月第1版 1988年3月第1次印刷

印数：1—3,000

ISBN 7-5424-0055-X/S·18 定价：1,10元

前 言

为了适应我国大家畜冷冻精液配种繁殖迅速发展的需要，培训畜牧兽医技术人员，推广人工授精技术，编者根据多年参加生产实践和科研工作的体会，在总结七十年代以来我国推广家畜冷冻精液人工授精技术经验的基础上，编写成这本书，作为广大畜牧兽医科技工作者和基层配种员、饲养员在工作实践中参考。

本书立足于我国的现状，注重于当代的世界先进水平，认真研究和总结我国各地的工作经验，介绍了大家畜冷冻精液人工授精的基本知识。内容包括国内外家畜精液冷冻保存技术进展，公母畜生殖器官的构造和功能，家畜的发情、配种，液氮和液氮罐，家畜冷冻精液的制造和使用以及常见不孕症的防治等。

本书由西北农学院邱怀教授审阅，并得到甘肃农业大学段李成副教授、甘肃省畜牧技术推广总站李炳文高级畜牧师、张建文畜牧师的大力帮助，芦欣石同志绘制全书插图，特此致谢。

由于编者水平所限，书中缺点和错误难免，恳请读者批评指正。

编 者

目 录

第一章	大家畜冷冻精液人工授精	
	技术发展概况	(1)
第一节	国外家畜人工授精生产水平及精液 冷冻保存科技进 展	(2)
第二节	国内家畜人工授精生产水平及精液冷冻保存科技进 展	(11)
第二章	家畜生殖器官和生理功能	(17)
第一节	公畜的生殖器官和生理功能	(17)
第二节	母畜的生殖器官和生理功能	(26)
第三章	家畜繁殖生理	(43)
第一节	公畜的生殖生理和母畜的发情生理	(43)
第二节	发情及发情鉴定	(57)
第四章	家畜配种技术	(87)
第一节	配种技术基本知识	(87)
第二节	配种方法	(92)
第五章	液氮及液氮罐	(111)
第一节	液氮的始创及生成	(111)
第二节	液氮的特性	(112)
第三节	液氮罐	(115)
第六章	家畜精液冷冻保存技术	(119)
第一节	牛冷冻精液操作技术	(119)

第二节	驴的冷冻精液操作技术	(135)
第三节	马的冷冻精液操作技术	(137)
第七章	母畜不孕症防治	(140)
第一节	母畜不孕症的分类及发病机制	(140)
第二节	卵巢疾病的防治	(145)
第三节	子宫、阴道疾病的防治	(150)
附	大家畜冷冻精液人工授精操作规程	(155)

第一章 大家畜冷冻精液人工授精技术发展概况

畜牧业现代化的主要标志是高的畜牧产品率和高的劳动生产率。七十年代以来，畜牧业逐渐走向工厂化的生产方式。它要求周密有效地对家畜进行饲养管理，减少甚至摆脱自然条件对畜体的影响，并多方面控制家畜的生命活动，提高其生产能力。使生产环节紧密相连，周期愈益缩短，大大提高产品率并降低劳动消耗。

在家畜繁殖方面，人为的控制已经能够改变或调整自然的繁殖规律。因此，在研究生殖生理理论的基础上，从性成熟、发情、配种、妊娠、分娩直到幼畜断乳，整个繁殖周期的各个阶段，出现了一系列的新方法，初步形成了一套完整的繁殖控制技术，因此，提出了“生物工程”的概念。而人工授精，特别是精液冷冻保存是家畜繁殖中迄今应用最为广泛，最有成效的一项先进技术，这为家畜育种、改良和提高繁殖率、商品率展示了广阔的远景。

二十世纪四十年代末期，科学家在鸡精液冷冻实践中，发现甘油能防止冻害，1952年，英国史密斯和波尔吉等人发现在牛精液稀释液中加入甘油，作为保护剂，在 -79°C 及 -196°C 超低温下冷冻保存受孕的成功，使家畜人工授精进入到一个崭新的时期。二十多年来，家畜精液冷冻保存不论在基础理

论和应用技术上，都有显著的改进和提高，组织日趋完善，技术设备不断更新。种畜饲养科学化，冻精生产机械化。近年来，随着电子自控技术的发展，家畜人工授精也有赖于分子生物学、遗传工程、绝缘容器、超低温等边缘学科的帮助，逐步进入冻精生产自动化的新阶段。由于牛的冷冻精液人工授精最先应用于生产，其推广应用进展较快，生产工艺越来越趋向机械化、自动化。1952年英国Polge和Rowson的安瓿法发展到1957年英国Bialy和Smith的载片冷冻法，1962年日本永濑的淀剂（颗粒）冷冻法，1964年法国Cassou的细管法，1968年美国Raiamdnnan和Gaham的薄层冷冻法发展到目前美国E. V. 拉尔森等人将牛冷冻颗粒精液抽干至含水量25%的冷冻干精液。除牛外，对猪、绵羊、山羊、马、驴、家禽及其他动物，精液冷冻保存研究也愈来愈受重视并取得较大突破和进展。英国波尔吉的一项试验，500余头初产母猪冻配受胎率达75%，罗马尼亚用0.25毫升细管法输精母羊35万只，受胎率变动在60—63%；中国1981年绵羊冻配受胎率达52%以上；马精液冷冻保存方面，日本已有保存7年的冻精，受胎率达65%；中国陕西畜牧兽医研究所1978年试验的驴的冻精，受胎率变动为55—70%。在北美、西欧、苏联和日本，鸡、火鸡、鸭和鹅的人工授精和精液冷冻保存技术的试验研究也有较快发展。

第一节 国外家畜人工授精生产水平 及精液冷冻保存科技进展

家畜人工授精技术，创始到现在将近200年，真正大面积

用于生产和深入研究还是二次世界大战以后，特别是二十世纪五十年代初期，英国史密斯和波尔吉等人研究牛精液超低温冷冻保存的成功是人工授精技术一个划时代的突破。美国E. V. 拉尔森研究的冻干精液。如能在技术上全面突破，将给家畜人工授精再一次带来重大改革。

一、国外家畜人工授精生产水平

人工授精是家畜繁殖中应用最广泛、最有成效的一项技术，近年来，普及率进一步提高，每年授精头数增多。据Bonddonna1976年不完全统计，世界上每年家畜人工授精（包括使用冷冻精液）母畜数，牛约1.2—1.5亿头，绵山羊约7000万只，猪约1000万头，马200万匹。人工授精数量较大、普及率较高的是欧洲和北美以及日本等经济发达的国家。

牛的人工授精普及率达90%以上的有丹麦、日本、捷克、匈牙利、保加利亚、法国、东德等。据1973年资料，国外使用冷冻精液授精母牛数达100万头以上的国家有15个。美国（近900万头），法国（700多万头），西德（400多万头），英国（300多万头），日本（200万头）以及加拿大、捷克、苏联等。其中美、法、加三国牛的人工授精已全部普及冷冻精液，英、日、西德也达80%左右。表1例举几个主要国家牛的人工授精和“冻配”普及率发展情况。

由于冷冻精液不受时间（英国已有保存25年的冻精）地点和种畜寿命的限制（种畜死后仍可照样繁殖）和能够高度发挥优秀个体种公畜的配种效率（一头种公牛每年可“冻配”母牛几千头至几万头）。因此，七十年代，世界六大洲八十多个国家得到推广普及。70年代以来进行牛冷冻精液出

表1 世界主要国家冻精普及概况

国 别	1960年—1962年 母牛人工授精数	当时“冻 配”普及 率	1971—1972年 母牛人工授精数	当时“冻 配”普及 率
美 国	664.6万头	37%	865.0万头	100%
英 国	162.0万头	3.5%	224.0万头	70%
法 国	400万头	0	722.0万头	100%
西 德	145.0万头	0	418.0万头	75%
加 拿 大	85.0万头	0	122.0万头	100%
日 本	79.4万头	0	176.0万头	84.8%
苏 联	1431.0万头	0	2300.0万头	61%*

*为人工授精普及率

口的国家发展到30多个。1973年进出口牛冷冻精液达460万份。近十年来，国外在应用“冻配”方法，反映在奶牛的育成尤为明显。仅美国为例，在没采用人工授精技术以前的1926年到1946年二十年，母牛平均产奶量增加11.6%，1946年头均产奶量不过1900公斤。在广泛采用人工授精技术以后的1946年到1966年，这二十年母牛平均产奶量增加65%，每头牛产奶量上升到3862公斤，特别是从1966年到1974年，仅八年时间“冻配”普及率上升到100%，每头牛平均产奶量增加到4666公斤。“冻配”除能迅速提高产奶量外，还能便于优中选优，发现培育突出的优秀母体。美国一头黑白花奶牛第七胎365天产奶量达23045公斤，创世界纪录。随着冷冻精液的广泛应用，肉牛的人工授精迅速发展起来，法国过去肉牛大多数自然交配，据1975年Elevage报导，法国的大型肉牛“夏洛来”和“利木辛”两个品种“冻配”突然猛增，分别

达到112万头和70万头以上，日本1972年肉牛“冻配”29万头，普及率由59.3%上升到1975年的70%。

目前国外冷冻精液人工授精的先进生产水平是：

(1)一头优良种公牛每年“冻配”的母牛数：一般平均为1500—3000头。新西兰为最高，平均8260头，法国4000头，美国、加拿大2500—3000头。

(2)受胎率：牛“冻配”一次情期受胎率约为60—70%，最终受胎率达80—90%；猪“冻配”受胎率67—75%；绵羊50—60%；马60—65%。

(3)输精次数：每受胎一头母牛所需输精次数平均为1.5次(1.3—3.0次)。

(4)精液冷冻保存时间：牛冷冻精液保存时间最长的已超过25年(英国)。日本已有保存7年马的冻精，受胎率达65%。

由于“冻配”的好处多，近十多年来，世界各个国家畜人工授精在组织上、技术上，以及冷冻精液生产工艺上都有较大的改进，如目前一些国家只设几个规模不同的牛人工授精中心站，以工厂化方式生产精液，并进行冷冻长期保存，不仅可以满足全国需要，还可以大量出口。美国全国只有67个站，古巴只有13个站，英国只有30个站。种公牛利用率显著提高，饲养头数大大减少，如新西兰全国适配奶牛65万头，但只有79头种公牛负担配种，平均每头负配8227头。

二、国外家畜精液冷冻保存科技进展

近年来，随着电子自控技术的发展，家畜冷冻精液人工授精有赖于边缘学科的帮助和现代化的科学实验手段，在精

液冷冻的基础理论和应用技术上有了新的突破。

(一) 冷冻精液生产工艺改革

冷冻精液技术, 从初期Polge等的缓慢冷冻、安瓿法、 -79°C 保存等, 几经研究, 形成现在的各种冷冻方法。这些方法, 根据冷冻速度(缓慢、半快速)、保存温度(-196°C 、 -79°C)等可区分为若干类别, 并依据精液容器的有无、种类、形状的不同可分为安瓿法、载片法、颗粒法、细管法、薄层法等, 其分类见表2。

(二) 精液品质检验进展

对种畜精液品质的检验, 过去多年一直沿用光学显微镜主观自评法。六十年代出现了TCF(电阻抗变频率法)。近年来出现了显微镜荧光屏法、显微电视录相法。最近西德又

表2 冷冻精液的方法

名 称 (年代、国家)	主 要 特 征	使用国家	应用有效 的 动 物	备 注
1. 安瓿法 1952. 英国	使用0.5、1.0ml容量的玻璃安瓿, 可自动化, 大量生产, 容易灭菌	美 国 加 拿 大	牛、马、 鸡	容量大、 冷冻和解 冻时温度 有变化
2. 载片冷 冻法 1957美国	将载玻片和盖玻片中的精液直接或介以纸张, 然后放在干冰上冷冻, 生存良好		牛	仅用于半 快 速 冷 冻, 不能 用 于 授 精, 只作 研究用

名 称 (年代、国家)	主 要 特 征	使用国家	应用有效的动物	备 注
3. 颗粒(锭剂)冷冻法 1962. 日本	将0.05—0.2ml精液在预冷的金属板(半圆形小孔内)滴冻, 受胎率高, 经济方便	欧洲、南美、古巴、中国、苏联等	牛、马、猪、兔、羊、人、鸡	用于半快速冷冻, 识别困难, 易感染, 自动化困难
4. 细管法 1964. 法国	容量0.25、0.5、1.0ml 塑料细管内冷冻, 输精时原管不动即可使用, 受胎率高, 经济性能高	欧洲、美洲、大洋洲、日本、南美	牛、马、羊、人、	便于自动化生产, 不易污染
5. 薄层冷冻法 1968. 美国	塑料细管薄层为矩形袋, 在袋内搞成薄层精液 5—10ml 冷冻, 冷冻均匀, 生存良好	日本、瑞典、美国	牛、猪	研究阶段
6. 冻干法	先制成颗粒冷精, 在-50℃低温下干燥到含水25%, 置室温下保存	美 国	牛、马	研究阶段

研究出记波照相法, 加拿大研究出光子对射分光镜法, 以及日本的电摄影计算光散技术, 利用这些先进的试验手段来评定、分析精子的活力和运动状态更为精确。

此外，为了深入观察精子的活力，运动状态，细微结构以及生化性状，电视磁带录相器、低温显微镜、透射显微镜、扫描电子显微镜，以及最近几年研制成的超导电子显微镜等已相继用于精子超微结构的研究，这些高精密度的仪器都是研究精子生理生化和冷冻精液基础理论方法最新的实验手段。

（三）精液处理方法进展

自1952年英国波尔吉研究试验牛冷冻精液成功以来，在冷冻前后的精液处理方法经过了很多研究，有了很大变化，但根本问题在于保持其生活的原形。基本变化如下述：

1. 精液稀释（添加甘油）

用含有5.0—7.0%浓度甘油的稀释液，添加甘油作为保护剂，其影响是依据基础液的性质而不同，在卵黄糖液时，室温下添加甘油，对精子不会发生危害。在卵黄糖液中加盐和三基（tris）制成的基础液就危害精子（主要是出现尾部卷曲）。加入卵黄时，牛、马、鸡、兔等精液容器浸入5℃冰水中进行快速冷却是可以的。猪、绵羊精液则需缓慢冷却。在冷冻过程中，有人发现精浆（精清）存在危害精子的因素，其中马、驴、山羊、猪、犬均被发现。山羊、猪精浆中为害因素有凝固卵黄的作用，两次危害精子。防止精浆破坏作法的方法有二，即400—500转/分离心分离法和将密度大的精液分段采取（猪、马、羊、犬）等二种方法。有人认为离心分离会造成精子细胞内物质的渗出，但马用含5%卵黄，3%柠檬酸钠和5%葡萄糖液等量混合液，猪用原精液作远心分离是有利的。

2. 无甘油精液稀释

有人认为稀释液中添加甘油会造成甘油渗入精子细胞内以及增加精子凝集作用，从而加速精子死亡，提出稀释液中不加甘油，而以DMSO乙酸酰胺、乳酸酰胺等药物代替，收到一定效果，见表3。

表3 以DMSO氯化物作防冻剂，兔颗粒冻精受胎成绩表

冻害防止剂* (浓度)	受精母畜			产仔数			
	计	分娩	分娩率** (%)	计	平均	标准 偏差	范围
DMSO(IM)	14	13	92.9	61	4.7	1.97	1—8
乙酸氯化物(IM)	16	14	87.5	71	5.1	2.20	1—8
乳酸氯化物(IM)	15	11	73.3	67	6.1	1.64	3—8

*基础液是卵黄(10%)加糖液(花田、永藤1972, 1976)

**分娩头数/授精头数

(四) 冷冻用稀释液进展

用于冻精的保存液目前力求配方简化。低温保护剂的试验研究进展很快。

1. 冷冻用稀释液配方

冷冻用稀释液，从理论上讲应由下列物质组成：

防冻害剂 + 冷冻保护剂 + 维持渗透压物质 + 抗生物物质

防冻害剂，过去一直使用5—7%的甘油。目前发现，兔精液用DMSO乙酸酰胺，乳酸酰胺的效果比甘油好。糖对牛、山羊、马的精子有效，但对兔精子效果非常低。对鸡、猪精子，分别用甘油超过2%和5%时，精子受害，但对鸡精子用DMSO、乙二醇的4%浓度，可以受精。

冷冻保护剂常用的是卵黄、牛奶蛋白质。目前有人认为牛的冷冻精液用脱脂奶稀释保存最为经济而效果最好，1976年保加利亚试验认为脱脂奶和乳糖混用效果更好。

维持渗透压物质多用柠檬酸钠、糖等，精子的生存性是受柠檬酸钠浓度的影响的。渗透性低，或完全没有渗透性的物质，例如5碳糖—4糖类、特定的三基（tris）剂，抗坏血酸等，因其防冻害效果低，仍可作为维持渗透压的物质。

抗生物物质，是以液态保存时代就广泛使用，除青霉素、链霉素外，还使用多粘菌素和土霉素。

2. 其他添加物

近年来，对稀释液的各种添加物效果发表了很多报告。淀粉酶、葡萄糖醛（甘）酸酶对受胎率都有效果。在猪精液冷冻时，重视了精子顶体的形态，用一种界面活性剂月桂硫酸钠，可以防止精子顶体变形，同时对精子的生存性具有良好的影响。TPD（丙二硫化硫胺、维生素B₁）、奎宁，对牛、人精子的运动都有效果，特别是前者，在日本被广泛应用。螯合剂的EDTA（乙二胺四乙酸钠等）用作马、猪精液稀释液、解冻液。此外，曾试验添加激素、前列腺素、咖啡硷等。

（五）牛以外动物精子冷冻保存成功及精子冷冻干燥的可能性

近年来，除牛冷冻精液推广普及外，其他动物精液冷冻保存的试验研究愈加深入，各国对猪、绵羊、山羊、马、鸡、鸭等精液冷冻保存在技术上已经突破，有些已经推广应用。精子冷冻干燥研究也取得进展，根据Larson和Granam，1976年试验结果如表4。

表4 不同含水量的冷冻干燥精子授精的牛受胎率

水 分 量	100%	50%	25%	12%	7%	0%
受胎率 ($\frac{\text{受胎数}}{\text{授配数}}$)	6/12	4/12	4/12	0/12	2/14	1/3

第二节 国内家畜人工授精生产水平 及精液冷冻保存科技进展

我国家畜人工授精在五十年代初期即在马、牛、羊、猪中开始研究和广用，近年来有了不同程度的发展，加速了家畜改良及育种工作的进展。1972年引进牛冷冻精液，先奶牛后肉牛，广泛应用于生产，绵羊、猪、熊猫等精液冷冻保存研究已取得技术上的突破，并应用于生产。

一、国内家畜人工授精生产水平

马的人工授精五十年代初在我国推广应用，东北地区开始最早，1958年大跃进时代在全国养马集中产地得到广泛应用，收效较大。如东北三省1972年人工授精母马43万多匹，占适龄繁殖母马的30%，情期受胎率40—50%。如人工授精开展较好的吉林农安县，1978年人工授精母马占可繁殖母马的89%，受胎率也逐渐提高（表5）。

牛的人工授精近年进展较快，奶牛冻配母牛已占70%以上、1978年全国冻配黄牛105万头，种公牛利用率和受胎效果逐年提高，黑龙江、吉林省、山西省等一些地区，县繁殖“三率”已达到七、八、九和八、八、九指标。水牛人工授