



山羊 生殖技术

主 编 © 周佳勃 岳顺利 佟慧丽



中国出版集团

世界图书出版公司



山羊 生殖技术

主 编 ◎ 周佳勃 岳顺利 佟慧丽

中 国 出 版 集 团
世 界 图 书 出 版 公 司
广 州 · 上 海 · 西 安 · 北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

山羊生殖技术 / 周佳勃, 岳顺利, 佟慧丽主编. --
广州: 世界图书出版广东有限公司, 2012.8
ISBN 978-7-5100-4944-6

I. ①山… II. ①周… ②岳… ③佟… III. ①山羊—
繁殖 IV. ① S827.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 155297 号

山羊生殖技术

责任编辑 杨力军 李 茜

封面设计 陈 璐

出版发行 世界图书出版广东有限公司

地 址 广州市新港西路大江冲 25 号

电 话 020-84459702

印 刷 武汉三新大洋数字出版技术有限公司

规 格 880mm×1230mm 1/32

印 张 11.25

字 数 280 千

版 次 2012 年 8 月第 1 版 2012 年 8 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5100-4944-6/S·0015

定 价 45.00 元

版权所有 侵权必究

前 言

中国山羊饲养历史悠久，人们在日常饲养实践中积累了很多经验。自古养羊以成群放牧为主。凡水草肥美的地方都是养羊的良好环境。特别值得骄傲的是，早在一千多年前，我国古代劳动人民凭借他们的聪明才智，就能够人为地干预羊的生殖，对羊进行选种及人工繁殖，取得了珍贵的羊生殖技术经验。《齐民要术》总结的前人选种经验为：常留腊月、正月生羔为种者为上，十一月、二月生者次之，羝（公羊）无角者更佳；羊羔生后 60 日皆能自活，可不必哺乳，产乳多的母羊堪为种者留作种用。明代《陶朱公致富奇书》指出，配种需选适当时期，哺乳期不宜配种。对配偶比例，《沈氏农书》认为以一雄十雌为宜，《豳风广义》则说：西北地区，一只公羊可配 10-20 只母羊，在非配种的春季可改为 50-60 只，是以公羊带群放牧配种的。由于秋羔多不良，古代蒙古牧羊者已知在春夏季以毡片裹羝羊之腹，防止交配。羊对于古代劳动人民来说是不可缺少的重要家畜之一。北朝民歌《敕勒歌》：“敕勒川，阴山下，天似穹庐，笼盖四野。天苍苍，野茫茫，风吹草低见牛羊”，就是当时畜牧业繁荣景象的真实写照。

近年来，随着我国国民经济及畜牧业方面的迅速发展，对于提高家畜的繁殖力及加速家畜的品种改良方面提出了更高的要求。虽然中国山羊养殖居世界第一，但若与养羊业发达国家相比，特别是在品种良种化、产品品质等方面，差距仍然很大。一些辅助生殖技术（ART）相继应用于加速山羊遗传改良的进程。如：山羊的人工输精（AI）和胚胎移植（ET）增加了选择的强度，羔羊的体外胚胎技术（JIVET）可以缩短世代间隔加速改良过程……

与正常育种进程相比，应用 ART 技术可培育出更多生产性能高的动物的后代。而且 ART 技术可以使季节性繁殖的山羊在非繁殖季节进行繁殖后代和产奶。

此外，现代分子生物学和细胞生物学理论与技术的发展，极大地推动了生殖生物学研究，使人们对生殖现象的认识深入到细胞和分子水平。从本质上讲，生殖过程是个体生命活动的一部分，与其它生命现象遵循共同的基本规律，如基因的时空特异性表达调控、细胞的增殖、分化和凋亡、细胞之间通过可溶性信号分子和细胞外基质相互作用等。但是，由于生殖过程在生命活动中担当特殊使命，因此也具有许多独特之处，如生殖细胞发生、性周期、受精、妊娠和分娩等等。现代生殖技术的应用使我们在山羊遗传育种方面取得了巨大的成绩，如培育了转基因山羊、改变了山羊诸多生产性能等，但也存在着一些亟待解决的。笔者多年从事山羊辅助生殖方面的研究工作，在生产实践中积累了相当多的实践经验。本书中，笔者在总结研究经验的同时将尽最大努力，综合国内外山羊生殖生物学领域的研究论文和著作，力求全面的介绍山羊畜牧生产中常用的山羊的超数排卵、人工输精、性别控制、体外受精、胚胎克隆、胚胎移植、生殖细胞保存等一系列技术，期待为广大山羊遗传育种研究工作者，提供一部系统的山羊生殖技术理论及实践的参考用书。书中周佳勃老师撰写第 9、10、11、12 部分内容约 12 万字、岳顺利老师撰写 5、6、7、8 部分约 8 万字、佟慧丽老师撰写第 1、2、3、4 部分约 8 万字。由于编者水平有限，书中定有不足之处，敬请广大读者提出宝贵意见。

编著者

2012 年 5 月

目 录

第 1 章 山羊生殖系统的结构与功能	1
1.1 公羊的生殖器官及功能	1
1.2 精液与精子	6
1.3 母羊的生殖器官及功能	15
1.4 卵子与卵泡的发育	19
第 2 章 山羊性行为及激素调节	24
2.1 山羊性成熟与性行为	24
2.2 发情鉴定	29
2.3 母羊的发情周期	30
2.4 性行为的调节机制	32
第 3 章 山羊生殖周期调控技术	39
3.1 同期发情	39
3.2 诱发发情	43
3.3 山羊的超数排卵	47
3.4 诱发分娩	51
第 4 章 受精、胚胎发育、妊娠及分娩	54
4.1 受精	54
4.2 早期胚胎发育	62
4.3 妊娠	68
4.4 分娩生理	72

第 5 章 山羊的性别控制及人工授精	84
5.1 山羊精液性控技术	84
5.2 山羊的人工授精技术	94
第 6 章 山羊体外受精及显微受精技术	102
6.1 山羊体外受精的研究	102
6.2 山羊显微受精技术	124
第 7 章 山羊体细胞移植技术	151
7.1 动物克隆研究的历史概况	151
7.2 哺乳动物核移植克隆技术研究进展	156
7.3 哺乳动物克隆基础理论的研究进展	169
7.4 体细胞克隆山羊的微卫星 DNA 分析	175
7.5 山羊克隆方案简介	176
第 8 章 山羊胚胎移植	207
8.1 胚胎移植的定义	207
8.2 胚胎移植的应用价值	208
8.3 胚胎移植的生理学基础	209
8.4 胚胎移植的程序和内容	211
8.5 胚胎移植的主要操作技术	212
第 9 章 山羊精液保存	221
9.1 山羊精液液态保存	221
9.2 山羊精液冷冻保存	241
第 10 章 山羊卵母细胞的保存	265
10.1 卵母细胞冷冻保存原理	265

10.2	冷冻保护剂	267
10.3	卵母细胞的冷冻方法	269
10.4	影响卵母细胞冷冻效果的因素	271
10.5	山羊卵母细胞保存常用的方法	282
10.6	卵母细胞冷冻保存的前景与展望	285
第 11 章	山羊胚胎冷冻	293
11.1	冷冻保存机理	293
11.2	冷冻保护剂的种类	294
11.3	动物胚胎冷冻保存的方法	295
11.4	山羊胚胎冷冻步骤	299
11.5	展望	301
第 12 章	山羊胚胎干细胞技术	303
12.1	胚胎干细胞的研究进展	303
12.2	山羊胚胎干细胞的分离与培养	326
	展望	352

第 1 章 山羊生殖系统的结构与功能

1.1 公羊的生殖器官及功能

公羊的生殖器官包括成对睾丸 (testis)、附睾 (epididymis)、输精管 (efferent duct)、尿道 (urethra)、阴茎 (penis)、包皮 (prepuce) 及附性腺 (accessory gland)，见图 1-1。附性腺包括精囊腺 (seminal vesicle)、前列腺 (prostate gland) 和尿道球腺 (bulbourethral gland)。公羊的生殖系统参与完成精子的发生和成熟，并将精子释放到雌性动物生殖道中。

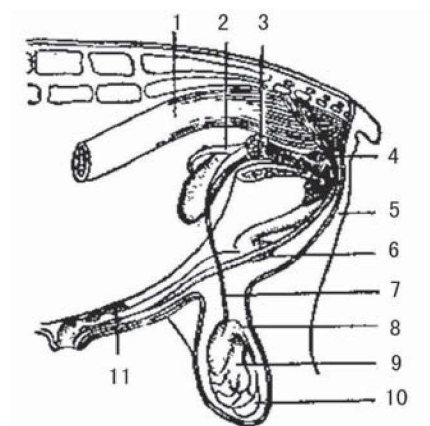


图 1-1 公羊的生殖器官

1. 直肠
2. 输精管壶腹部
3. 精囊腺
4. 尿道球腺
5. 后躯
6. 阴茎的 S 状弯曲
7. 输精管
8. 附睾头
9. 睾丸
10. 附睾
11. 阴茎游离端

1.1.1 睾丸

1.1.1.1 睾丸的组织学结构

睾丸分左、右两个，呈椭圆形。睾丸的外表被覆以浆膜（即固有鞘膜），其下为致密结缔组织构成的白膜。白膜由睾丸的一端（即和附睾头相接触的一端）形成一条宽为 $0.5 \sim 1.0\text{cm}$ 的结缔组织索伸向睾丸实质，构成睾丸纵隔，纵隔向四周发出许多放射状结缔组织小梁伸向白膜，称为中隔。它将睾丸实质分成许多锥体形小叶。每个小叶内有一条或数条蟠曲的精细管，其直径为 $0.1 \sim 0.3\text{mm}$ ，管腔直径 0.08mm ，腔内充满液体。

曲细精管在各小叶的尖端先各自汇合，穿入纵隔结缔组织内形成弯曲的导管网，称作睾丸网，为精细管的收集管，最后由睾丸网分出 $10 \sim 30$ 条睾丸输出管，汇入附睾头的附睾管。精细管的管壁由外向内是由结缔组织纤维、基膜和复层的生殖上皮构成。上皮可分为生精细胞和足细胞（Sertoli cell）两种。足细胞又称支持细胞、塞托利氏细胞（Sertoli cell）。体积较大而细长，但数量较少，属体细胞。呈辐射状排列在精细管中，其底部附着在精细管的基膜上，游离端朝向管腔，常有许许多个精子镶嵌在上面。该细胞高低不等，界限不清。细胞核较大，位于细胞的基部，着色较浅，具有明显的核仁，但不显示分裂现象。由于它的顶端有数个精子伸入胞浆内，故一般认为此种细胞是对生精细胞起着支持、营养、保护等作用。足细胞失去功能，精子便不能成熟。

1.1.1.2 睾丸的生理功能

（1）产生精子。曲精细管的生殖细胞经过多次分裂后最后形成精子。精子随精细管的液流输出，并经直精细管、睾丸网、输出管而至附睾并贮存于附睾。

（2）分泌雄激素。间质细胞分泌的雄激素，能激发公羊的性欲及性兴奋，刺激第二性征，刺激阴茎及副性腺的发育，维持精子发

生及附睾精子的存活。

(3) 产生睾丸液。由精细管和睾丸网产生大量的睾丸液。含有较高浓度的钙、钠等离子成分和少量的蛋白质成分。主要作用是维持精子的生存和有助于精子向附睾头部移动。

1.1.2 附睾

1.1.2.1 附睾的组织学结构

附睾是贮存精子和精子最后成熟的地方，也是排出精子的管道。附睾附着于睾丸的附着缘，分头、体、尾部分。睾丸输出管在附睾头部汇成附睾管。附睾管极度弯曲，其长度约 35 ~ 50 米，管腔直径 0.1 ~ 0.3 毫米。管道逐渐变粗，最后称为输精管。附睾管壁很薄，其上皮细胞具有分泌作用，分泌物呈弱酸性，同时具有纤毛，能向附睾尾方面摆动，以推动精子移行。附睾尾部很粗大，有利于贮存精子。附睾管的上皮分泌物可供精子营养。附睾管的管壁包围一层环状平滑肌，在尾部很发达，有助于在收缩时，将浓密的精子排出。

1.1.2.2 生理功能

附睾是精子最后成熟的地方，睾丸曲精细管生产的精子，刚进入附睾头时形态上尚未发育完全。此时活动微弱，没有受精能力。精子通过附睾管时，附睾管分泌的磷脂及蛋白质，形成脂蛋白膜，附在精子表面将精子包起来，它能在一定程度上防止精子肿胀，也能抵抗外部环境的不良影响。精子通过附睾管时，获得负电荷，可以防止精子彼此凝集。

附睾能够储存精子。在附睾内贮存的精子，60 天内具有受精能力。如贮存过久，则活力降低，畸形及死精子增加，最后死亡被吸收。所以长期不配种的公畜，第一、二次采得的精液，会有较多衰弱和死亡的精子。反之，如果配种过频，则会出现发育不成熟的精子，其标志是精子尾部有原生质滴，故须很好掌握配种频度。精

子之所以能在附睾内长期贮存的原因尚不完全清楚。但一般认为,是由于附睾管上皮的分泌作用能供给精子发育所需的养分;附睾内为弱酸性(pH 值为 6.2 ~ 6.8),可抑制精子活动;附睾管内的渗透压高,精子发生脱水现象,导致精子缺乏活动所需的最低限度的水分,故不能运动;附睾温度也较低。这些因素可使精子处于休眠状态,减少能量的消耗,从而为精子的长期贮存创造了条件。

附睾管有吸收作用。附睾头及附睾体可以吸收大量来自睾丸的稀薄精子悬浮液。附睾管还具有运输作用。精子在附睾内不能活动,主要靠纤毛上皮活动,以及附睾管平滑肌的蠕动作用才能通过附睾管。

1.1.3 输精管

输精管是精子由附睾排出的通道。它的管壁较厚,并比较坚实,分左、右两条。输精管是由附睾管延伸而来,沿腹股沟管到腹腔,折向后方进入盆腔。输精管是一条壁很厚的管道,主要功能是将精子从附睾尾部运送到尿道。输精管的开始部分弯曲,后即变直,到输精管的末端逐渐形成膨大部,称为输精管壶腹,其壁含有丰富的分泌细胞,具有分泌作用。输精管在接近膀胱括约肌处,通过一个裂口,进入尿道。输精管的肌层较厚,交配时收缩力较强,可以把精子推入尿道内。在输精管也能够贮存部分精子。

1.1.4 副性腺

副性腺包括精囊腺、前列腺、尿道球腺。射精时,它们的分泌物,加上输精管壶腹的分泌物混合在一起称为精清,与精子共同组成精液。

1.1.4.1 精囊腺

位于输精管末端的外侧,呈蝶形覆盖于尿生殖道骨盆部前端。羊的精囊腺为致密的分叶状腺体,腺体组织中央有一较小的腔。羊精囊腺的排泄管和输精管,共同开口于尿道起始端顶壁上的精阜,

形成射精孔。分泌物为弱碱性、粘稠的胶状物质；含有高浓度的球蛋白、柠檬酸、酶以及高含量还原性物质，如维生素C等；其分泌物中的糖蛋白为去能因子，能抑制顶体反应，延长精子的受精能力。分泌物为淡乳白色粘稠液体，含有高浓度的蛋白质、果糖和柠檬酸盐等成分，其作用是供给精子营养和刺激精子运动。

1.1.4.2 前列腺

位于精囊腺的后方，由体部和扩散部组成。山羊和绵羊的前列腺仅有扩散部，且为尿道肌包围，故外观上看不到。公羊的前列腺分泌物是不透明稍粘稠的蛋白样液体。其含有果糖、蛋白质、氨基酸及大量的酶，如糖酵解酶、核酸酶、核苷酸酶、溶酶体酶等，对精子的代谢起一定作用；分泌物中还含有抗精子凝集素的结合蛋白，能防止精子头部互相凝集；还含有钾、钠、钙的柠檬酸盐和氯化物。其生理作用是中和阴道酸性分泌物，吸收精子排出的二氧化碳，促进精子的运动。

1.1.4.3 尿道球腺

位于尿生殖道骨盆部后端，是成对的球状腺体，羊的尿道球腺特别发达，呈棒状。尿道球腺分泌物为无色、清亮的水状液体，pH值为7.5～8.5。其生理作用为在射精前冲洗尿生殖道内的剩余尿液；进入阴道后可中和阴道酸性分泌物。

1.1.5 阴茎

阴茎是排精和排尿的共同管道，分骨盆部和阴茎两个部分，膀胱、输精管及副性腺体均开口于尿生殖道的骨盆部。阴茎主要由海绵体构成，包括阴茎海绵体、尿道阴茎部和外部皮肤。成年公羊阴茎全长约为30～35厘米，2周岁公羊阴茎比成年短5～10厘米。

阴茎的血液循环与勃起机理：分布在阴茎的动脉有阴茎背动脉和阴茎深动脉。阴茎背动脉是营养性血管，主要是供给海绵体营养。阴茎深动脉是功能性血管，其分支走行于每个海绵体中央的小梁中并沿途发出弯弯曲曲的分支，叫螺旋动脉；螺旋动脉的末端注

入海绵体血窦。在螺旋动脉的内膜中有平滑肌纵索，它平时收缩使内膜发生褶皱，阻塞管腔。在性冲动传来时，平滑肌索发生松弛，螺旋动脉管腔畅通。结果，大量血液流入海绵窦。海绵窦腔的扩大，压迫小梁中的静脉而使血液回流受阻，海绵体充血而勃起。冲动过后，平滑肌索收缩，螺旋动脉闭塞，流入血量减少，海绵体内的血压降低，血液经海绵体边缘的静脉徐徐流出，阴茎恢复静止状态。

包皮是由皮肤凹陷而发育成的皮肤褶。在不勃起时，阴茎头位于包皮腔内。

1.1.6 阴囊

公羊的阴囊呈袋状，贴近躯体，位于肛门的下方，内里贮藏睾丸、腹睾和部分精索。皮肤薄而富有弹性，易于移动和扩张。内膜有平滑肌纤维，在阴囊正中形成阴囊中隔，将阴囊分为左右两个互不相同的囊腔，内含有睾丸和附睾。

阴囊能保护睾丸和附睾。阴囊还能调节与维持睾丸温度使它低于体温的一定温度。血液进入公羊精索动脉以前的温度是 39°C ，进睾丸后，动脉的血温为 34.4°C ，睾丸静脉血温为 33°C ，离开精索后，静脉血温升高为 38.6°C 。阴囊内温度一般比体温低 $4\sim 5^{\circ}\text{C}$ 。这对于生精机能至关重要。气温低时阴囊皱缩，睾丸靠近腹壁并使阴囊变厚；气温高时阴囊松弛，睾丸位置降低，阴囊壁变薄。

1.2 精液与精子

精液是由精子和精清两部分组成，是一种不透明的粘稠液体，呈弱碱性，具有特殊腥味。精清是副性腺和附睾的分泌物。精液的成分十分复杂。公羊的射精量随品种不同差异较大。

1.2.1 生精细胞与精子发生

在性成熟以前，曲精小管的管腔很小，管壁上除支持细胞外仅见有精原细胞（spermatogonia）。到性成熟时，精原细胞开始增殖和分化，管壁上由外向内依次出现初级精母细胞（primary spermatocyte）、次级精母细胞（secondary spermatocyte）、精细胞（spermatid）和精子（spermatozoon）。由精原细胞发育分化形成精子的过程，叫做精子发生（spermatogenesis）。

1.2.1.1 精原细胞

它是双倍体细胞，位于生精小管的外周，紧靠在基膜上。细胞较小，呈圆形或卵圆形，细胞器不发达。核大而圆，染色质细密，着色深，有1~2个核仁。

精原细胞是生精干细胞，通过有丝分裂来增殖数目。在不同动物，一个原始精原细胞进行的有丝分裂次数不同。在山羊，精原细胞一共进行5次有丝分裂。A型干细胞分裂产生两个A型精原细胞。其中一个开始分化，另一个变为新的A型干细胞。开始分化的A型精原细胞分裂产生两个中间（I）型精原细胞，中间型精原细胞再分裂产生两个B型精原细胞，后者再经两次分裂产生初级精母细胞。新的A型干细胞在刚产生后先停止发育，直到它的姊妹A型精原细胞产生出初级精母细胞时，它才再分裂，又产生出一个A型干细胞和一个向下分化的A型精原。这样，就保证了精子发生过程的连续性，不断有精子生成。

1.2.1.2 初级精母细胞

它刚由B型精原细胞分裂产生的初级精母细胞形态与B型精原细胞差不多。后来，初级精母细胞体积明显长大，可达到B型精原细胞的二倍，成为生精细胞中个儿最大的，紧靠在精原细胞的内侧排成1~2层。

初级精母细胞的胞质内细胞器较发达，大多数细胞处于分裂

期，有明显的分裂相。

1.2.1.3 次级精母细胞

它由初级精母细胞经过第一次减数分裂产生稍小一些的次级精母细胞，位于初级精母细胞的内侧，结构与初级精母细胞相似。由于次级精母细胞很快就分裂，没有间期，故在生精小管切片上很难见到。

1.2.1.4 精细胞

由次级精母细胞经过第二次减数分裂产生出精细胞。精细胞在次级精母细胞内侧排列成数层，胞体很小，核圆而小且深染，核仁明显。

精细胞不再分裂，而是经过复杂的精子成型过程变为精子。精子成型（spermiogenesis）过程包括：（1）由精细胞的高尔基复合体产生出顶体泡，后者不断增大成帽状，盖在核的前半部，成为顶体。（2）中心体移动到顶体对侧，在核下方发出鞭毛的轴丝。（3）核浓缩，变长。（4）细胞质向核下方移动，线粒体集中到鞭毛近端，连接成线粒体带，围绕鞭毛缠绕形成线粒体鞘。（5）多余的细胞质折离，精细胞变成精子。

1.2.1.5 精子

哺乳动物精子为蝌蚪状，分头、颈和尾三部分。刚成型精子的头部群集在支持细胞的游离端，尾巴朝向管腔。进一步成熟后，精子脱离支持细胞而进入管腔内。

根据精子的性染色体类型将精子分为两种：即 X（染色体）精子和 Y（染色体）精子，前者比后者大 7% 左右。若 X 精子钻入卵内（尾部留在外面）与卵细胞核相结合形成合子，则发育为雌性；如果是 Y 精子与卵细胞相结合，则后代发育为雄性。

1.2.2 曲精小管的上皮周期

从山羊精原细胞发育到成熟山羊精子约需 40 ~ 49 天。既然此过程如此之长，那么，是如何保证睾丸内随时都有精子成熟的

呢？原来，生精小管各段的精子发生并不是同步的；后一段比前一段的略晚，于是精子一批接一批地发生。在睾丸切片上，不同段生精小管具有不同的生精细胞组合。在同一生精小管上，某一段的细胞组合周期性地反复出现，称之为曲精小管的上皮周期，也叫精子发生波（spermatogenic wave）。一个周期内所包括的细胞组合数不同。在山羊曲精小管的上皮周期包括8种细胞组合，即8期。

第一期 生精小管内无精子，精细胞及其核均为圆形，核淡染，可见初级精母细胞和精原细胞。

第二期 精细胞及其核都变为长形，核染色深，可见到精原细胞和初级精母细胞。

第三期 精细胞变得更长，呈束状排列，在精细胞之间有大的初级精母细胞。

第四期 发生第一次减数分裂，可见到次级精母细胞。

第五期 发生第二次减数分裂，出现新形成的圆形精细胞。

第六期 老一代精细胞变形成精子，开始从支持细胞核的附近移开。新一代精细胞染色质分散，核界限不清。

第七期 老一代精子继续向管腔移动，新一代精细胞核仍然染色较浅。

第八期 精子脱离支持细胞进入生精小管的管腔。

1.2.3 精子的形成

精子细胞形成后不再分裂，而在支持细胞的顶端、靠近管腔经复杂的形态变化，形成蝌蚪状的精子。精子细胞的高尔基体形成精子的顶体系统，线粒体形成线粒体鞘，细胞质形成原生质滴。