

大熊猫人工授精繁殖试验

刘维新 叶掬群 李成忠 廖国新

(北京动物园)

大熊猫是稀有珍贵动物,饲养条件下难于繁殖,原因之一是成年雄兽不易配种。因此,要开展大熊猫的繁殖工作,采用人工授精技术是十分必要的,它不仅解决配种问题,而且对探索大熊猫的繁殖规律也有助益。

我们于1978年4月下旬至6月上旬对大熊猫进行了人工授精试验,初步获得成功。1978年9月8日一只人工授精的雌熊猫“娟娟”,一胎生下2只幼仔(图1)。



图1 大熊猫“娟娟”及其幼子“元晶”

一、材料和方法

试验选用的大熊猫都是本园饲养的成年个体,体质健康无疾病,无论雌兽或雄兽,都是一只动物占一间兽舍,单独饲养,实验期间未作激素处理。

1. 采精

根据野生动物的特点,用电刺激直肠法采精。

(1) 动物状况 进行采精试验的三只雄兽,分别在北京动物园饲养了一年半到五年半

本文1979年1月13日收到。

不等。饲养期间任何一只都不曾配过种,无求偶行为,体质处于中上。

采精时我们对三只雄兽都作了外观检查。“宝宝”的睾丸软而有弹性,在阴囊内滑动范围大,但右侧睾丸先天性不完全下垂,肛腺分泌物较多。“娄娄”的睾丸有弹性,比“宝宝”稍差,其在阴囊内滑动的范围小,肛腺分泌物较多。“滨滨”睾丸较硬,在阴囊内基本不滑动,肛腺基本无分泌物。

(2) 器械 主要器械为电刺激采精器和双极直肠探棒。电刺激采精器的输入电压为220伏,可调频率20—60赫兹,输出可调电压0—20伏,输出电流0—1000毫安,输出波形为正弦波。直肠探棒由探把和探头组成。探把长12厘米,适于大熊猫用的探头长30厘米,直径2厘米,上面嵌有八个略高出探头表面的铜环,环的间隔为2.5厘米,奇数环和偶数环为不同的电极。

(3) 操作过程 1) 麻醉保定:肌注氯氨酮4—6毫克/公斤,辅以安定0.17—0.20毫克/公斤麻醉保定。2) 通电刺激:探头插入直肠10—13厘米(即两组电极以上)较适宜。插入的深度十分重要,若过深,即使最适刺激强度,也只引起阴茎勃起而不见排精;若太浅如5厘米以下,则后肢往往出现剧烈的强直,甚至有时使已勃起的阴茎缩回包皮,也不排精。刺激时探头贴紧背侧效果较好。一般情况下,刺激电压3伏,频率20赫兹,电流40毫安时无反应;刺激电压6—9伏,频率20—30赫兹,电流100—280毫安时阴茎逐渐勃起,勃起比较充分时龟头呈“元宝”状,不充分时呈圆锤状。刺激电压9—12伏,频率30—40赫兹,电流260—360毫安时排精。用排精时的刺激指数重复刺激3—5次结束采精。每次通电刺激时间和间息各为5—7秒。刺激过程中,臀部及前肢出现强直,后肢比前肢强烈,有时还引起排粪,但是从未有过排尿现象。如果动物对引起排精的刺激反应强烈,则往往在刺激停止后过几秒钟才排精。3) 集精:以牛或羊用集精杯,集精前把水温调到37℃左右,气温低时可略高。采精时动物的姿势和集精效果紧密相关,但是不论取那一种姿势都必须将尿道孔对正集精杯口,同时一定要把后肢固定牢靠才能顺利集精。根据我们的具体条件,使动物呈仰卧式比较方便,每头一次最多收集2.28毫升,最少只有0.70毫升。

2. 精液的处理

采精结束后务必迅速进行处理,否则,对精子的活率会产生不利影响。

(1) 外观检查 镜检观察精子作前进运动时头部横向摆动比牛羊等家畜明显,形态与其他哺乳类的精子基本相同。

(2) 精子的活率检查 所采几次精液活率最高的为90%,最低的为40%。

(3) 原精液的稀释和保存 我们作了低温(0—5℃)保存和超低温(—196℃)保存两种处理方法,用了两种不同的稀释液。即时或数天之内输精用的精液以卵黄柠檬酸钠稀释液处理,超低温(—196℃)保存的用蔗糖-甘油-卵黄稀释液处理。

1) 卵黄柠檬酸钠稀释液的配制:双重蒸馏水100毫升,柠檬酸钠1.6克,柠檬酸钾0.11克,磷酸二氢钠0.15克,葡萄糖0.97克,磺胺0.1克,新鲜卵黄20毫升,摇匀,最后加入兽用青霉素5—10万国际单位,现用现配。

2) 蔗糖-甘油-卵黄稀释液的配制和成分:12%蔗糖溶液75.3毫升,甘油4.7毫升,新鲜卵黄20毫升,摇匀,最后加入青霉素5—10万国际单位,当日用当日配。

3) 取原精液缓缓注入洗净并经过严格消毒过的刻度离心管或刻度试管中,此后慢慢注入稀释液,轻轻摇匀,保存备用。低温(0—5℃)保存者稀释2—5倍;超低温(—196℃)保存者

稀释 3—4 倍。

3. 输精

输精时以麻醉保定,方法同前。待雌兽进入深度麻醉后立即开始操作,使其呈仰卧姿势,背部略高,固定牢靠。输精时把精液由保存温度提高到 35—38℃。

开腔器为漏斗状透明玻璃管,插入阴道端内径 1.8 厘米,外径 2.0 厘米,端口光滑,漏斗端外径 4.5 厘米,内径 4.0 厘米,长度 22.5 厘米。输精器为羊用者,茶色玻璃质,全长 30 厘米,容器部分长 9.2 厘米,探管部分 20.8 厘米,探管外径 0.50 厘米,尖端 0.35 厘米。

大熊猫阴道长 8—12 厘米。输精器自子宫颈口插入 2—3 厘米左右,即把精液缓缓注入,一般每次输入稀释 3—4 倍者 1 毫升。

输精的时间掌握在发情期。从生殖器官和行为的变化亦可以判断动物是否进入发情期。大熊猫的发情期 2—3 天,但个别熊猫的发情期要长一些。

二、试验结果及其分析

1. 采精

试验期间对三只雄性大熊猫作了六次采精,每次都采得一定数量的精液,不同个体精液的质量亦不同(表 1)。从表 1 中可看出,试验期“宝宝”的精液质量最好,超低温处理后活率仍在 40—45%;“姍姍”居中;“滨滨”较差。联系上述对三只雄熊猫外观检查结果,我们认为熊猫睾丸的弹性及其在阴囊内的状态如何,在一定程度上可以反映出当时睾丸的机能状况,有弹性并在阴囊内滑动,机能状况较好,否则较差。

2. 精液的处理

以卵黄柠檬酸钠稀释液处理和保存的精液,原精液活率 75%—85% 者稀释 2—5 倍,稀释后活率达 70%—80% (表 1),置于 0—5℃ 温度下,保存 72 小时活率仍可维持 30% 左右。

表 1 精液收集量及活率

日 期	动物呼名	精液的 收集量 (毫升)	原精液 活率 (%)	卵黄柠檬酸钠 稀释液处理		超低温(−196℃)处理				备注
				稀释倍数	稀释后活 率(%)	稀释倍数	稀释后活 率(%)	平衡后 活率*	冷冻后活 率(%)	
1978. 4. 18	宝宝	1.30	85	5	80					年龄约 10 岁
1978. 4. 20		2.28	80	4	80	4	60	60	40	
1978. 6. 3		1.70	90			3	80	60	45	
1978. 4. 24	姍姍	1.70	75	2	70					年龄约 10 岁
1978. 6. 3		0.97	80			3	60	50	30	
1978. 4. 20	滨滨	0.70	40	4	40					年龄约 8 岁

* 平衡后活率: 0—5℃ 温度下处理 3—5 小时后,升温到 37—38℃ 检查存活率。

超低温(−196℃)处理的精液活率最低者 30%, 最高者可达 45% 左右(表 1)。1978 年没有用超低温处理的精液输精。

3. 输精

在发情季节,我们对四只熊猫进行了十次输精试验,其中一只受孕并产了仔。现简要地分析输精后受孕或未受孕的原因。

婷婷：生殖器官和行为的变化不具发情期的特征，输精一次，全部精液都输入，仍未怀孕。不孕的原因可能是雌兽未排卵。

川川：生殖器官和行为的变化始终没出现发情期的特征，无颤叫和求偶行为，阴道涂片有核上皮细胞居多，可能是卵泡成熟过程受到某种阻滞，动物未出现发情期。虽然三次输精都是将精液全部输入子宫颈口内也未能怀孕。

芳芳：根据生殖器官的变化，18日出现发情期的特征，至25日仍有发情特点，但阴道分泌物浓缩成栓塞状，似将进入发情后期。在此期间输精三次，未见动物产仔。未见产仔的原因有两种看法。一种看法认为“芳芳”曾怀孕，可能是流产了，产下的胎儿被母兽吃掉，因为预产期前的行为同该母兽过去正产时一样，舐阴门，精神略有不安；另一种看法认为根本未受孕，不受孕的原因可能是18日输精略早，在精子具备受精活率期间卵子未进入输卵管。24日输精时精液返流到阴道，可能未输入子宫颈口内，这样就不能保证有足够的精子到达受精地点。25日一次输精，虽全部输入子宫颈口，但动物已进入发情后期，亦无受孕的可能。

娟娟：23日动物外阴变化及性行为都处于巅峰状态，24日晨动物外阴及性行为的变化比23日稍减，处发情巅峰状态开始下降之时。在24日上午十点半左右输精二次，其中一次全部返流回阴道，另一次全部输入子宫颈口。25日输精一次，有部分精液流回阴道。27日输精一次，但精子活率仅20%，母兽生殖器的特征似进入发情后期。该母兽于当年九月八日下午六时卅分左右产下二仔。分析输精情况，25日和27日不理想，受孕的可能性较小，24日的一次输精，掌握的时间，精液活率和输精效果都很理想，故这次受孕的可能性最大。照此计算妊娠期为137—138天。

通过输精试验，初步可以认为要使母熊猫受孕，需要注意：（1）母熊猫应处在发情期最高潮或自最高潮开始下降时输精；（2）需有一定密度的精液，其精子活率应在30%以上，要把精液输入子宫颈口内。

4. 幼仔

“娟娟”所产两只小熊猫均发育良好。第二仔初生重125克，人工喂养64小时，患肺炎死亡。第一仔取名“元晶”由雌熊猫哺育，15日龄395克，目前生长发育良好（图1）。

三、小 结

大熊猫人工授精试验的成功，为繁殖这种珍贵动物开辟了新的途径。同时也证实在本园饲养条件下，雄性大熊猫性腺发育基本正常，所形成的精液正常。据观察和触摸，雄兽在发情季节比平时活动量大，肛腺分泌物增多，蹲抹分泌物频繁，睾丸柔软，富有弹性，在阴囊内滑动范围增大，根据采精结果，可以认为这些现象可能是发情的表现。

致谢：本试验承蒙广东省昆虫研究所、广州动物园、广东省科技局实验工厂以及北京种公牛站的热情帮助，深表谢忱。

参 考 文 献

- [1] 广东省昆虫研究所动物研究室等，动物学杂志，1977，3：42—43。
- [2] 北京市畜牧兽医站，牛的人工授精技术，1977，12—23。
- [3] Rowlands, I. W., *Int. Zoo Year Book*, 14 (1974), 230—233。
- [4] Jones, R. C., *Nature*, 243 (1973), 38—39。