

圈养大熊猫冷冻精液对其种群遗传多样性的作用

王东辉^{1,2,3} 刘玉良^{1,2,3} 沈富军^{1,2,3} 蔡志刚^{1,2,3} 安俊辉^{1,2,3} 侯蓉^{1,2,3*}

(1 成都大熊猫繁育研究基地, 成都610081) (2 四川省濒危野生动物保护生物学重点实验室, 成都610081)

(3 四川省大熊猫科学研究院, 成都610081)

摘要: 在过去34年的圈养大熊猫种群保护工作中, 我们成功建立了全球最大的大熊猫精子库, 目前已保存50只大熊猫个体总计7 000余支细管冷冻精液(冻精)。冷冻精液一方面可以使物种的遗传资源得到长久保存, 另一方面可以通过人工授精的方式促进种群繁育。但是, 圈养大熊猫冷冻精液对其种群遗传多样性的作用尚未有明确报道。本研究首先根据成都大熊猫繁育研究基地2000—2014年冷冻精液人工授精数据, 对比分析了冻精人工授精个体和圈养种群的遗传多样性。结果显示, 冻精人工授精个体遗传多样性均高于同年圈养种群的平均遗传多样性, 表明在繁殖年份中冻精人工授精可以显著提高圈养大熊猫种群的遗传多样性。统计精子库中所有冻精个体的平均血缘系数并与圈养种群进行对比分析, 探究冷冻精液对圈养种群遗传多样性的潜在作用。结果显示, 精子库中有21只已死亡个体的精液, 其中有66.67%的个体平均血缘系数低于圈养种群; 有14只20岁以上个体的精液, 其中有50.00%的个体平均血缘系数低于圈养种群; 另有15只20岁以下个体的精液, 其中有53.33%的个体平均血缘系数低于圈养种群, 表明冷冻精液对圈养种群遗传多样性的保护具有重要价值。综上所述, 冷冻精液不但有效保存了大熊猫遗传资源, 而且在保护圈养种群遗传多样性方面具有积极的促进作用。

关键词: 大熊猫; 冷冻精液; 人工授精; 遗传多样性

中图分类号: Q347

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050(2022)03-0261-09

The effect of frozen semen of captive giant pandas on their population genetic diversity

WANG Donghui^{1,2,3}, LIU Yuliang^{1,2,3}, SHEN Fujun^{1,2,3}, CAI Zhigang^{1,2,3}, AN Junhui^{1,2,3}, HOU Rong^{1,2,3*}

(1 Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, Chengdu 610081, China)

(2 Sichuan Key Laboratory of Conservation Biology for Endangered Wildlife, Chengdu 610081, China)

(3 Sichuan Academy of Giant Panda, Chengdu 610081, China)

Abstract: In the past 34 years of captive giant panda population protection, we have successfully established the world's largest giant panda sperm bank, which has preserved a total of 50 giant panda individuals with more than 7 000 straws of frozen semen. On one hand, frozen semen can preserve the genetic resources of the species for a long time. On the other hand, it can promote population reproduction through artificial insemination (AI). However, the role of frozen semen of captive giant pandas in their population genetic diversity has not been clearly reported. This study firstly analyzed the frozen semen AI data from 2000 to 2014 in Chengdu Research Base of Giant Panda Breeding, and compared the genetic diversities of frozen semen individuals and the captive population. The results showed that the genetic diversities of frozen semen individuals were higher than the captive population in the same breeding year, indicating that frozen semen AI can significantly improve the genetic diversity of the captive giant panda population in the breeding year. Secondly, the mean kinship (mK) of all frozen semen individuals in the sperm bank were calculated and compared with the captive population to explore the potential effect of frozen semen on the genetic diversity of the captive population. The results showed that the sperm bank conserved 21 dead individuals, of which 66.67% individuals had a lower mK

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0501701); 四川省杰出青年基金(2020JDJQ0074); 成都大熊猫繁育研究基地自立课题(2020CPB-B07)

作者简介: 王东辉(1989-), 男, 博士, 助理研究员, 主要从事大熊猫生殖与发育生物学研究. E-mail: wangdh889@163.com

收稿日期: 2021-10-20; **接受日期:** 2022-02-23

* 通讯作者, Corresponding author, E-mail: hourong2000@panda.org.cn

than the captive population. There were 14 semen from surviving individuals over 20 years old, of which 50.00% individuals had a lower mK than the captive population. There were 15 surviving individuals under 20 years old, of which 53.33% individuals had a lower mK than the captive population. This result indicated that frozen semen has a great value in protecting the genetic diversity of the captive population. In conclusion, frozen semen not only effectively preserved the genetic resources of giant pandas but also played a positive role in protecting the genetic diversity of the captive population.

Key words: Giant panda; Frozen semen; Artificial insemination; Genetic diversity

由于栖息地破坏、全球气候变化以及人类活动的干扰,许多野生动物种群正在减少。为保护野生动物遗传和物种多样性,人工辅助生殖技术不断发展革新,在圈养野生动物繁育与遗传多样性的保护中发挥重要作用。常规人工辅助生殖技术主要包括人工授精、体外受精和胚胎移植。通过人工辅助生殖技术使繁育个体成功繁殖,可有效管理和拯救小种群 (Ballou, 1984)。此外,开发“种质资源库”(精子、卵子和胚胎冷冻保存),可以使高遗传价值种质资源得以保存并延续,进一步提升种群高质量繁殖的潜力,维持物种多样性。

Veprintsev 和 Rott (1979) 首先提出利用人工辅助生殖技术和建立种质资源库的方式管理圈养野生动物种群的概念。通过该方式可以提高圈养种群个体繁殖效率,同时便于种群的遗传管理 (Wildt *et al.*, 2010)。目前,已经有报道多个野生动物圈养种群成功使用冷冻精液(冻精)人工授精繁殖,如两栖类 (Kouba *et al.*, 2013)、云豹 (*Neofelis nebulosa*) (Tipkantha *et al.*, 2017)、猎豹 (*Acinonyx jubatus*) (Wildt *et al.*, 1997)、虎猫 (*Leopardus pardalis*) (Swanson *et al.*, 1996)、弯角大羚羊 (*Oryx dammah*) (Morrow *et al.*, 2000) 和苍羚 (*Gazella dama mhorrr*) (Roldan *et al.*, 2006)。此外,冻精人工授精也成功用于某些灵长类动物繁殖中,如狨猴 (*Callithrix jacchus*) (Morrell *et al.*, 1998) 和猕猴 (*Macaca mullatta*) (Gabriel Sanchez-Partida *et al.*, 2000)。但是,仍有部分物种随着种群遗传多样性的减少,种群繁殖无可持续性而濒临灭绝。据预测,野外白犀牛 (*Ceratotherium simum*) 种群将在 2023 年之前灭绝 (Di Minin *et al.*, 2015)。对于这些极度濒危的物种来说,建立种质资源库可确保遗传资源长久保存,防止种群遗传基因丢失,未来可将死亡或非生育个体遗传信息重新注入到种群繁殖中,为种群的复壮提供潜力。使用冷冻保存

20 年的精液成功实现黑足鼬 (*Mustela nigripes*) 的个体繁殖,实现了“死亡复活”并显著恢复了种群的基因多样性 (Howard *et al.*, 2016)。

大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 是我国特有的古老珍稀物种,在地球存活了 800 万年之久,有动物界“活化石”的美誉。20 世纪 80 年代大熊猫已濒临灭绝,为保护大熊猫种群实施了迁地保护计划。大熊猫迁地保护计划不仅要保护大熊猫免于灭绝,还要繁育健康和高遗传多样性的后代。1978 年,北京动物园首先采用大熊猫鲜精进行人工授精获得成功,1980 年成都动物园首先应用超低温保存的颗粒冻精成功进行了人工授精 (胡锦矗, 1990)。近年来人工繁育大熊猫数量实现快速优质增长,“十三五”期间繁育成活大熊猫 258 只*,使圈养种群达到自我维持状态。当前圈养大熊猫种群的繁殖方式主要采取自然交配和鲜精人工授精,少数采用冻精人工授精。2017 年的一项回顾性研究分析了 1996—2016 年总计 304 只圈养大熊猫繁殖数据,结果显示自然交配的产仔率为 60.7%,冻精人工授精的产仔率为 18.5% (Li *et al.*, 2017)。目前冻精人工授精技术的产仔率较低,但是着眼于大熊猫种群的长远可持续发展,冷冻精液遗传学价值将会越来越大。因此,本文总结分析了 2000—2014 年冻精人工授精对圈养种群的遗传多样性作用以及建立的大熊猫精子库对圈养种群未来发展的潜在影响,综合分析了圈养大熊猫冷冻精液对其种群的遗传管理价值,为大熊猫种群繁育与保护提供理论依据。

1 研究方法

1.1 实验动物

根据国家林业和草原局制定的大熊猫繁育配对方案,成都大熊猫繁育研究基地人工授精的大

* 新华社. 2021. 大熊猫、苏铁等珍稀濒危野生动植物种群“十三五”实现恢复性增长. http://www.gov.cn/xinwen/2021-01/04/content_5576927.htm

熊猫个体。7只参与冻精人工授精的雌性个体均性成熟, 年龄为5~18岁(平均年龄=10岁)。用于采集精液的雄性个体均达到性成熟。

1.2 精液采集

采用直肠微电流刺激的方式采集繁殖季节性成熟雄性大熊猫精液, 精液采集全程在大熊猫麻醉中进行。麻醉前, 大熊猫禁食禁水约12 h。首先肌肉注射氯胺酮(4~8 mg/kg)麻醉雄性大熊猫, 然后在采集精液过程中使用异氟烷进行呼吸式麻醉。用电射精采精仪(Boring, 美国)进行电刺激采精。电压2~8 V, 持续2 s后间歇性休息2 s, 出现射精立刻停止刺激, 将精液收集到采精杯中。休息30 s后, 重复电刺激采精2~3次后, 完成采精过程。

1.3 精液冷冻与解冻

大熊猫精液冷冻按照之前文献报道的方法完成(Santiago-Moreno *et al.*, 2016)。方法简述如下: 将采集的鲜精用冷藏液(Irvine Scientific, 美国)以1:1 (v/v) 的比例稀释在15 mL试管中, 将试管置于装有150 mL 37℃水的烧杯中, 在4℃冰箱中放置3 h后加入含有12%甘油浓度的冷冻液(Irvine Scientific), 使甘油终浓度为3.33%, 精子密度为 $400 \times 10^6/\text{mL}$, 将精液在4℃放置1 h; 最后, 将精液吸入0.25 mL冻精细管(Fujihira, 日本)中, 置于液氮面上方7.5 cm处熏蒸1 min, 再转移至液氮面上方2.5 cm处熏蒸1 min后投入液氮中长期保存。

精液解冻方法按照Wang等(2020)方法进行。从液氮中取出冻精细管快速放入50℃水浴中解冻10 s, 然后将精液吹入15 mL试管底部, 并加入400 μL 的改良Ham's F10(Irvine Scientific)解冻液置于37℃水浴中孵育。

1.4 人工授精

用于人工授精的精液质量要求解冻后精子活力大于50%, 运动状态大于3.0, 37℃下体外存活时间大于4 h, 精子畸形率小于30%。首先用温水清洗雌性大熊猫外阴及周围区域, 再用温生理盐水冲洗。缓慢将无菌开腔器旋转插入阴道中并抵到宫颈开口处, 然后将输精管缓慢抵入宫颈口。用注射器吸取1.2 mL精液, 连接到输精管接口处, 缓慢将精液注入宫颈内; 间隔6~8 h后进行第二次人工授精。

1.5 平均血缘系数分析

平均血缘系数(mean kinship, mK)是用来衡量群体内各个体的遗传重要性的指标。mK值越小表示该个体在群体中的亲属越少, 其携带的等位基因在群体中越稀有且容易丢失, 因此具有较高的遗传重要性; 反之, mK值越大则表示该个体遗传重要性程度越低(沈富军等, 2002)。本研究中冻精个体和整个圈养大熊猫种群的mK值均查自2019年更新的大熊猫谱系“The 2019 International Studbook For Giant Panda (*Ailuropoda melanoleuca*)”(Xie, 2019)。mK的具体计算方法参考张志和和魏辅文(2006)。计算公式:

$$mK_i = \frac{\sum_{j=1}^N K_{ij}}{N} \quad (1)$$

其中 K_{ij} 为个体*i*和*j*之间的血缘系数; *N*为种群中的个体数目。

1.6 遗传多样性分析

统计了成都大熊猫繁育研究基地(以下简称基地)2000—2014年共7只个体的冻精人工授精情况(表1)。冻精个体的遗传多样性(建群者基因多样性的保留程度)(genetic diversity, GD)以及圈养大熊猫种群GD值均取自于对应繁殖年份。计算公式:

$$GD_i = 1 - mK_i \quad (2)$$

1.7 数据处理

数据分析采用SPSS 20.0软件(IBM Corp., 美国), 冻精个体与种群GD值的差异比较分析采用Student's *t*-test, 数据用mean $\pm$ SD表示, $P < 0.05$ 在统计学上有差异。mK计算采用PMx软件(Lacy *et al.*, 2012)。冻精个体mK分布统计采用GraphPad Prism软件(5.0)(GraphPad Software Inc., 美国)。

2 结果

2.1 冻精人工授精对同年圈养大熊猫种群遗传多样性的作用

将每只冻精人工授精个体(冻精个体)的遗传多样性与同年圈养大熊猫种群的遗传多样性进行对比。结果显示每一个冻精个体遗传多样性均高于对应繁殖年份圈养种群(图1A), 整体比较分析也显示所有冻精个体的平均遗传多样性显著高于圈养种群(图1B)。

表1 2000—2014年大熊猫冻精人工授精个体参数及平均血缘系数(mK)

Table 1 Individual parameters and mean kinship (mK) values of giant pandas in artificial insemination with frozen semen from 2000 to 2014

雌性个体 Female			雄性个体 Male		
谱系号 Studbook number	出生日期 Date of birth	繁殖年份 Year of breeding	谱系号 Studbook number	出生日期 Date of birth	平均血缘系数 Mean kinship
408	1994. 8. 31	2000	287	~ 1984. 8	0. 028 4
297	1985. 9. 24	2000	386	1992. 7. 26	0. 019 2
407	1994. 8. 31	2002	390	1992. 9. 14	0. 026 3
297	1985. 9. 24	2003	377	~ 1991. 8	0. 004 4
401	1993. 9. 19	2007	386	1992. 7. 26	0. 020 0
561	2003. 8. 1	2008	377	~ 1991. 8	0. 010 6
523	2000. 9. 12	2014	624	~ 2004	0. 002 2

繁殖个体以其谱系号代表, mK 值以对应繁殖年份计算为准

Mated individuals are represented by their studbook numbers, mK values are calculated according to the corresponding breeding year

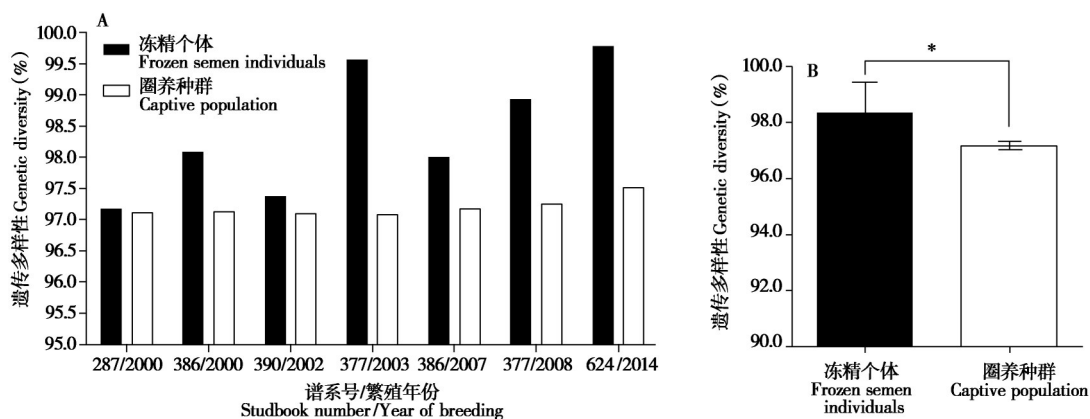


图1 冻精人工授精个体(冻精个体)与对应繁殖年份大熊猫种群的遗传多样性比较。A: 2000—2014年人工授精中每个冻精个体遗传多样性与对应繁殖年份种群遗传多样性; B: 2000—2014年人工授精中所有冻精个体平均遗传多样性与圈养种群的比较。数据以平均值 $\pm$ 标准差表示。* $P < 0.05$

Fig. 1 Genetic diversity of frozen semen individuals compared to the giant panda population in the corresponding breeding year. A: From 2000 to 2014, the genetic diversity of every frozen semen individual in artificial insemination and the giant panda population in the corresponding breeding year. B: Statistical comparison of the average genetic diversity of all frozen semen individuals in artificial insemination to the giant panda population from 2000 to 2014. Quantified data show the mean $\pm$ SD. * $P < 0.05$

2.2 精子库中保存的已死亡个体精液对种群遗传多样性的潜在影响

截止2021年7月底, 基地大熊猫精子库中保存21只已死亡个体的精液。该21只个体mK值分布范围广, 个体间差异较大(图2A)。与圈养种群mK值($mK = 0.0228$)比较, 7只个体mK值高于圈养种群, 占个体总数的33.33%; 66.67%的个体(14只)mK值在圈养种群mK值之下(图2B), 这14只个体中35.71%的个体(5只) $mK = 0.0000$, 7.14%的个体(1只)mK值在0.0010~0.0050, 28.57%的个体(4只)mK值在0.0050~0.0100, 21.43%的个体(3只)mK值在0.0100~0.0150, 7.14%的个

体(1只)mK值在0.0150~0.0228(图2C)。

2.3 精子库中保存的20岁以上存活个体精液对种群遗传多样性的潜在作用

截止2021年7月底, 基地大熊猫精子库中保存14只20岁以上存活个体的精液。该14只个体mK值与圈养种群mK值($mK = 0.0228$)比较, 除个别与圈养种群mK相差较大外, 大部分个体更为接近圈养种群mK值(图3A)。14只个体中有7只个体mK值高于0.0028(图3B)。此外, 对低于0.0228的7只个体mK值进行分析, 其中有14.29%的个体(1只)mK值在0.0000~0.0010, 有14.29%的个体(1只)mK值在0.0050~0.0100,

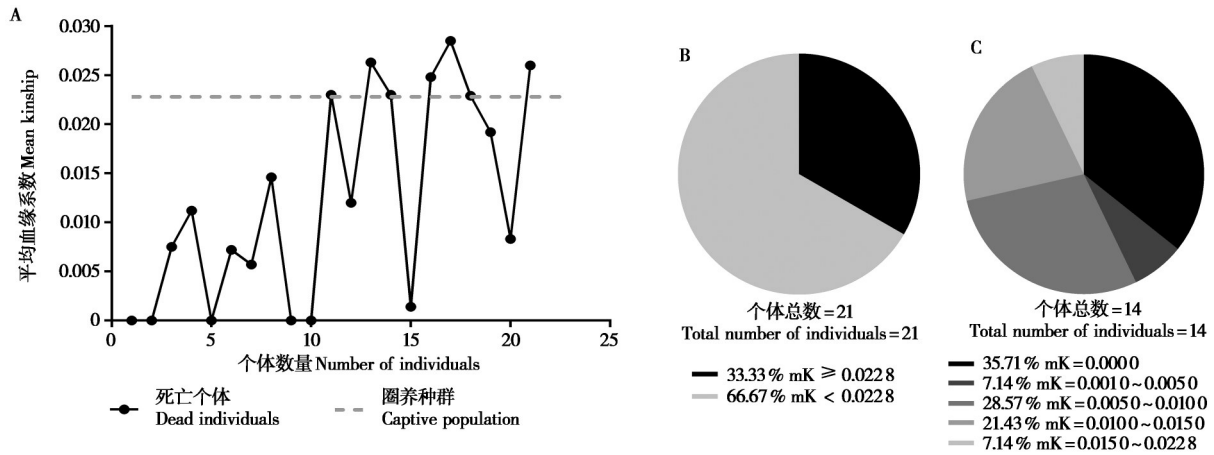


图2 精子库中保存死亡个体平均血缘系数 (mK) 值统计. A: 冻精个体 mK 值与圈养种群 mK 值; B: 与圈养种群 mK 值对比, 各冻精个体 mK 值; C: 低于圈养种群 mK 值的冻精个体 mK 值, 不同颜色区域代表不同 mK 值范围

Fig. 2 The mean kinship (mK) values of preserved dead individuals in the sperm bank. A: mK values of frozen semen individuals and captive population; B: Pie chart of mK values of each frozen semen individual with the mK values of captive population as a comparison; C: Pie chart of mK values of frozen semen individuals below the mK values of captive population, with different color areas representing different mK ranges

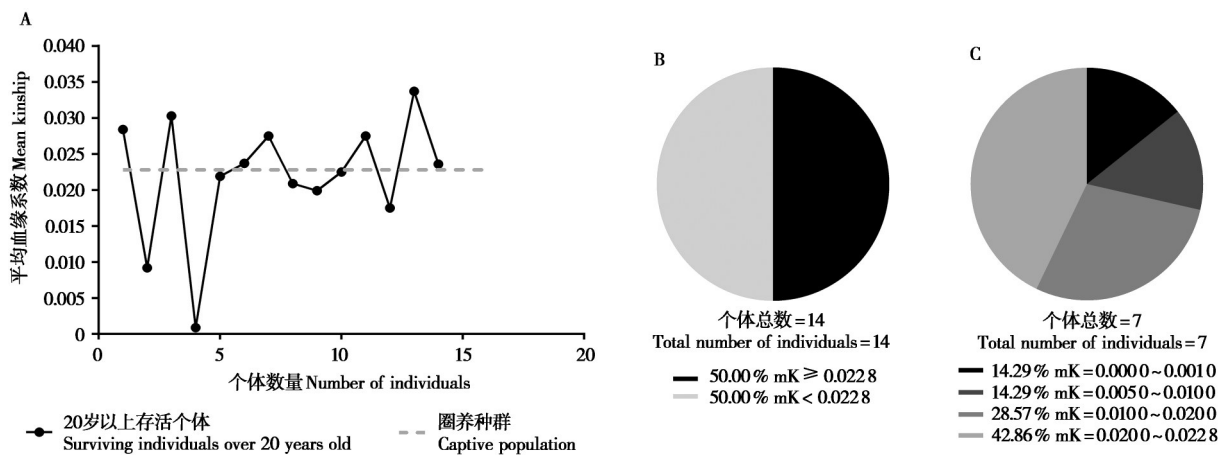


图3 精子库中保存20岁以上存活个体平均血缘系数 (mK) 值统计. A: 冻精个体 mK 值与圈养种群 mK 值; B: 与圈养种群 mK 值对比, 各冻精个体 mK 值; C: 低于圈养种群 mK 值的冻精个体 mK 值, 不同颜色区域代表不同 mK 值范围

Fig. 3 The mean kinship (mK) values of surviving individuals over 20 years old kept in sperm bank. A: mK values of frozen semen individuals and captive population; B: Pie chart of mK values of each frozen semen individual with the mK values of captive population as a comparison; C: Pie chart of mK values of frozen semen individuals below the mK values of captive population, with different color areas representing different ranges of mK values

有 28.57% 的个体 (2 只) mK 值在 0.0100~0.0200, 有 42.86% 的个体 (3 只) mK 值在 0.0200~0.0228 (图 3C)。

2.4 精子库中保存的 20 岁以下存活个体精液对种群遗传多样性的潜在作用

截止 2021 年 7 月底, 基地大熊猫精子库中还保存有 15 只 20 岁以下个体的精液。该 15 个个体的

mK 值不规则分布在圈养种群的 mK 值水平线两侧, 个体间差异较大 (图 4A)。与圈养种群的 mK 值 (mK = 0.0228) 进行对比, 15 只个体中有 46.67% 的个体 (7 只) mK 值高于圈养种群 mK 值, 53.33% 的个体 (8 只) mK 值在圈养种群 mK 值之下 (图 4B)。此外, 对低于圈养种群 mK 值的总计 8 只个体 mK 值进行分析, 其中有 12.50% 的个体 (1 只) mK =

0.000 0, 有 25.00% 的个体 (2 只) mK 值在 0.001 0 ~ 0.010 0, 有 37.50% 的个体 (3 只) mK 值在 0.010 0 ~

0.020 0, 有 25.00% 的个体 (2 只) mK 值在 0.020 0 ~ 0.022 8 (图 4C)。

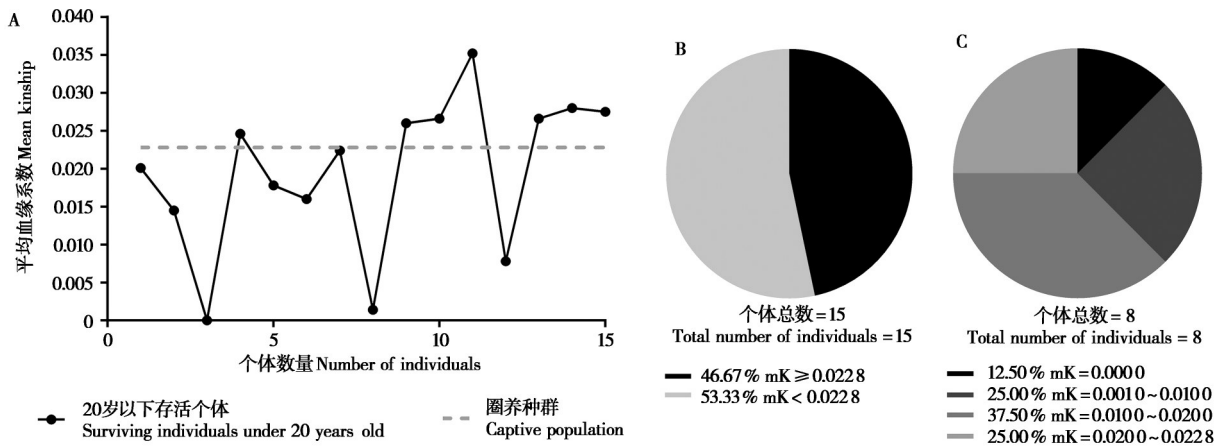


图4 精子库中保存20岁以下存活个体平均血缘系数(mK)值统计. A: 冻精个体mK值与圈养种群mK值; B: 与圈养种群mK值对比, 各冻精个体mK值; C: 低于圈养种群mK值的冻精个体mK值, 不同颜色区域代表不同mK值范围

Fig. 4 The mean kinship (mK) values of surviving individuals under 20 years old kept in the sperm bank. A: mK values of frozen semen individuals and captive population; B: Pie chart of mK values of each frozen semen individual with the mK values of captive population as a comparison; C: Pie chart of mK values of frozen semen individuals below the mK values of captive population, with different color areas representing different ranges of mK values

3 讨论

遗传资源低温冷冻保存是保护珍稀物种遗传多样性的有力工具 (Blackburn, 2018)。近几十年, 精液采集和冷冻保存技术快速发展, 已经成功应用于部分濒危物种的种群繁殖和管理 (Hermes *et al.*, 2009; Hildebrandt *et al.*, 2012, 2021; Howard *et al.*, 2016)。种质资源的长期保存和利用可以延长种群的世代长度, 并允许在较小的种群中保持较高水平的遗传变异 (Comizzoli, 2015), 能够拯救更多的濒危物种。大熊猫精液冷冻保存历经了40余年的发展, 提高冷冻精液的应用潜力对进一步改善圈养大熊猫种群的遗传多样性具有重要意义。本文从大熊猫冻精人工授精和冻精保存两方面系统分析了圈养大熊猫冷冻精液对其种群遗传多样性的作用, 为大熊猫种群遗传管理提供科学依据。

交配机会少是导致大熊猫生育力低下的主要因素, 大部分圈养雄性大熊猫不能够自然交配 (Zhang *et al.*, 2021)。冻精人工授精不仅解决了自然交配困难个体的繁殖问题, 而且冻精便于运输, 解决繁殖地域隔离问题, 进一步促进了种群的遗传管理。本研究分析了2000—2014年大熊猫冻精

个体与种群的遗传多样性及冷冻精液对圈养种群遗传多样性的作用, 发现大熊猫冻精个体的遗传多样性均高于繁殖年份种群的平均遗传多样性, 说明在对应繁殖年份中冻精人工授精对整个种群遗传多样性具有促进作用。濒危野生动物种群数量极少, 能够参与的繁殖个体更为稀少, 增加自然交配困难个体的繁殖概率可以促进种群遗传多样性。2020年史密森尼保护生物学研究所 (Smithsonian Conservation Biology Institute) 报道使用冻存5年的精液成功使雌性大熊猫受孕并产仔 (Comizzoli, 2020), 进一步证实了精液冷冻保存对大熊猫遗传多样性保护的重要作用。

精子库是了解和维持物种繁殖以及保护生物多样性的宝贵工具。建立精子库可以永久保存物种的生殖资源, 保护现有的物种遗传多样性免受不可预知的危害, 包括对野生种群的灭绝灾难 (Roelke-Parker *et al.*, 1996)。目前成都大熊猫繁育研究基地大熊猫精子库中保存有50只个体总计7000余支细管精液, 涵盖的个体中有部分是已死亡个体或老龄个体。这些个体不仅精液存量极为有限, 而且具有较高的遗传价值。通过对比分析冻精的死亡个体与圈养种群的mK值, 发现21只

死亡个体中有 14 个个体的 mK 值低于圈养种群, 表明已死亡个体的遗传价值较高, 对于圈养种群遗传多样性的提高具有促进作用。值得注意的是, 其中有 5 只死亡个体的 mK 值为零, 这意味着该个体尚未繁殖后代, 在当前种群中其遗传信息处于丢失状态, 增加了种群遗传多样性保护的难度。同样地, 圈养非洲草原象 (*Loxodonta africana*) 种群正面临遗传多样性下降问题, 研究者提出解决这一难题的有效且可持续的方法是从野外象群中引入精液用于圈养种群繁殖 (Hermes *et al.*, 2013)。目前圈养大熊猫种群虽然呈现可自我维持状态, 无需从野外种群引入精液, 但 mK 值为零的死亡个体的冷冻精液对于当前圈养种群就是全新的种质资源, 未来将其用于繁殖生产, 能够增加圈养种群的遗传多样性。

基地大熊猫精子库中还保存了 29 只存活个体的精液, 其中 20 岁以上 14 只。圈养大熊猫平均寿命约 25 ~ 30 岁, 20 岁以上已经趋于老龄化状态, 繁殖能力逐年下降, 逐渐退出繁殖计划。通过 mK 值的对比分析, 发现有 50.00% 的老年个体 mK 值低于圈养种群, 且有 4 只个体 mK 值小于 0.020 0, 说明老年个体的冷冻精液不但具有丰富圈养种群遗传多样性的潜在价值, 而且部分属于高遗传价值个体, 未来对圈养种群遗传多样性的维持将发挥更大的作用。20 岁以下的个体中有 53.33% 的个体 mK 值低于圈养种群, 同样表明这部分个体的冻精具有较高的遗传价值。值得注意的是, 这部分个体是当前繁殖计划的主体, 主要采取自然交配以及鲜精人工授精的方式。因此, 本文分析的冻精个体 mK 值在圈养种群中的分布会随着后代出生而发生改变, 但是精液的长久保存会增加繁殖的世代间隔, 在未来的圈养种群繁殖中同样具有遗传价值。建立精子库保存物种遗传多样性同样适用于其他濒危野生物种。据报道, 世界上大多数野生猫科动物因栖息地丧失、破碎化和偷猎等导致数量锐减, 2/3 的猫科动物在国际自然保护联盟 (International Union for Conservation of Nature, IUCN) 的红色名录中被列为受威胁物种 (IUCN, 2021)。为防止种群灭绝, 迁地保护种群繁育工作尤为关键。然而, 由于繁殖成功率低、建群者数量少和种群规模小, 北美动物园的大多数圈养猫科动物种群无法仅靠自然繁殖维持种群长期可持

续发展 (Swanson, 2006)。提升精液冷冻水平, 建立精液资源库保存死亡个体和未繁育个体的精液资源, 实现野外个体精液与圈养种群的基因交流可以有效提高种群的遗传多样性, 促进圈养种群高质量可持续发展 (Vansandt *et al.*, 2021)。

综上所述, 无论是从用于繁殖生产已兑现的遗传价值还是尚未用于繁殖生产潜在的遗传价值方面, 大熊猫冷冻精液都能够提升圈养大熊猫种群遗传多样性, 对圈养种群的遗传管理具有积极的促进作用。

随着大熊猫种群繁殖的世代更替, 冷冻精液在圈养种群繁殖与管理中的作用日益凸显。但是, 目前冷冻精液直接用于种群繁殖还需解决以下 3 个关键难题: (1) 低温冷冻过程会造成精子损伤, 显著降低精子活力 (Spindler *et al.*, 2004, Wang *et al.*, 2020), 因此发展精液冷冻技术进一步提升大熊猫冻精质量仍是未来大熊猫繁殖研究的重点; (2) 大熊猫精子库中的精液质量参差不齐, 其中约有 20% 的精液解冻后的活力低于 30%, 无法用于人工授精, 导致其使用潜力过低, 需要对精子库中冻精进行质量优选, 提高现存冻精质量达到人工授精标准, 提高利用率; (3) 与自然交配相比, 大熊猫冻精人工授精产仔率仍然较低, 2004—2010 年中国大熊猫保护研究中心进行了 20 次冻精人工授精, 产仔率为 25% (Huang *et al.*, 2012), 因此还需要在人工授精技术方面进行改进, 进一步提高人工授精产仔率。相信通过繁育技术的不断革新, 冷冻精液会在大熊猫繁殖中发挥更大的作用, 进一步丰富圈养大熊猫种群遗传多样性。

参考文献:

- Ballou J D. 1984. Strategies for maintaining genetic diversity in captive populations through reproductive technology. *Zoo Biology*, 3 (4): 311–323.
- Blackburn H D. 2018. Biobanking genetic material for agricultural animal species. *Annual Review of Animal Biosciences*, 6: 69–82.
- Comizzoli P. 2015. Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian Journal of Andrology*, 17 (4): 640–645.
- Comizzoli P. 2020. Birth of a giant panda cub after artificial insemination with frozen-thawed semen: A powerful reminder about the key role of biopreservation and biobanking for wildlife conservation. *Biopreserv Biobank*, 18 (5): 349–350.
- Di Minin E, Laitila J, Montesino-Pouzols F, Leader-Williams N, Slotow R, Goodman P S, Conway A J, Moilanen A. 2015. Identi-

- fication of policies for a sustainable legal trade in rhinoceros horn based on population projection and socioeconomic models. *Conservation Biology*, **29** (2): 545–555.
- Gabriel Sanchez-Partida L, Maginnis G, Dominko T, Martinovich C, McVay B, Fanton J, Schatten G. 2000. Live rhesus offspring by artificial insemination using fresh sperm and cryopreserved sperm. *Biology of Reproduction*, **63** (4): 1092–1097.
- Hermes R, Goritz F, Saragusty J, Sos E, Molnar V, Reid C E, Schwarzenberger F, Hildebrandt T B. 2009. First successful artificial insemination with frozen-thawed semen in rhinoceros. *Theriogenology*, **71** (3): 393–399.
- Hermes R, Saragusty J, Goritz F, Bartels P, Potier R, Baker B, Streich W J, Hildebrandt T B. 2013. Freezing african elephant semen as a new population management tool. *PLoS ONE*, **8** (3): e57616.
- Hildebrandt T B, Hermes R, Goeritz F, Appeltant R, Colleoni S, de Mori B, Diecke S, Drukker M, Galli C, Hayashi K, Lazzari G, Loi P, Payne J, Renfree M, Seet S, Stejskal J, Swegen A, Williams S A, Zainuddin Z Z, Holtze S. 2021. The art of bringing extinction to a freeze—history and future of species conservation, exemplified by rhinos. *Theriogenology*, **169**: 76–88.
- Hildebrandt T B, Hermes R, Saragusty J, Potier R, Schwammer H M, Balfanz F, Vielgrader H, Baker B, Bartels P, Goritz F. 2012. Enriching the captive elephant population genetic pool through artificial insemination with frozen-thawed semen collected in the wild. *Theriogenology*, **78** (6): 1398–1404.
- Howard J G, Lynch C, Santymire R M, Marinari P E, Wildt D E. 2016. Recovery of gene diversity using long-term cryopreserved spermatozoa and artificial insemination in the endangered black-footed ferret. *Animal Conservation*, **19** (2): 102–111.
- Hu J C. 1990. *Research and Progress in Biology of the Giant Panda*. Chengdu: Sichuan Scientific and Technical Press, 1–8. (in Chinese)
- Huang Y, Li D S, Zhou Y M, Zhou Q, Li R G, Wang C D, Huang Z, Hull V, Zhang H M. 2012. Factors affecting the outcome of artificial insemination using cryopreserved spermatozoa in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Zoo Biology*, **31** (5): 561–573.
- IUCN. 2021. The iucn red list of threatened species. Version 2021–3. <https://www.iucnredlist.org>.
- Kouba A J, Lloyd R E, Houck M L, Silla A J, Calatayud N, Trudeau V L, Clulow J, Molinia F, Langhorne C, Vance C, Arregui L, Germano J, Lermen D, Togna G D. 2013. Emerging trends for bio-banking amphibian genetic resources: The hope, reality and challenges for the next decade. *Biological Conservation*, **164** (8): 10–21.
- Lacy R C, Ballou J D, Pollak J P. 2012. Pmx: Software package for demographic and genetic analysis and management of pedigreed populations. *Methods in Ecology and Evolution*, **3** (2): 433–437.
- Li D S, Wintle N J P, Zhang G Q, Wang C D, Luo B, Martin-Wintle M S, Owen M A, Swaisgood R R. 2017. Analyzing the past to understand the future: Natural mating yields better reproductive rates than artificial insemination in the giant panda. *Biological Conservation*, **216**: 10–17.
- Morrell J M, Nubbemeyer R, Heistermann M, Rosenbusch J, Kuderling I, Holt W, Hodges J K. 1998. Artificial insemination in *Callithrix jacchus* using fresh or cryopreserved sperm. *Animal Reproduction Science*, **52** (2): 165–174.
- Morrow C J, Wolfe B A, Roth T L, Wildt D E, Bush M, Blumer E S, Atkinson M W, Monfort S L. 2000. Comparing ovulation synchronization protocols for artificial insemination in the scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). *Animal Reproduction Science*, **59** (1–2): 71–86.
- Roelke-Parker M E, Munson L, Packer C, Kock R, Cleaveland S, Carpenter M, O'Brien S J, Pospischil A, Hofmann-Lehmann R, Lutz H, Mwamengele G L, Mgasa M N, Machange G A, Summers B A, Appel M J. 1996. A canine distemper virus epidemic in serengeti lions (*Panthera leo*). *Nature*, **379** (6564): 441–445.
- Roldan E R, Gomendio M, Garde J J, Espeso G, Ledda S, Berlinguer F, del Olmo A, Soler A J, Arregui L, Crespo C, Gonzalez R. 2006. Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: Preservation of genetic variation through the organization of genetic resource banks. *Reproduction in Domestic Animals*, **41** (Suppl 2): 82–92.
- Santiago-Moreno J, Estes M C, Pradice J, Castano C, Toledano-Diaz A, O'Brien E, Lopez-Sebastian A, Martinez-Nevado E, Delclaux M, Fernandez-Moran J, Zhang Z H. 2016. Giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) sperm morphometry and function after repeated freezing and thawing. *Andrologia*, **48** (4): 470–474.
- Shen F J, Zhang Z H, Li G H, Zhang A J. 2002. Pedigree analysis of captive giant panda. *Acta Genetica Sinica*, **29** (4): 307–313. (in Chinese)
- Spindler R E, Huang Y, Howard J G, Wang P, Zhang H, Zhang G, Wildt D E. 2004. Acrosomal integrity and capacitation are not influenced by sperm cryopreservation in the giant panda. *Reproduction*, **127** (5): 547–556.
- Swanson W F, Howard J G, Roth T L, Brown J L, Alvarado T, Burton M, Starnes D, Wildt D E. 1996. Responsiveness of ovaries to exogenous gonadotrophins and laparoscopic artificial insemination with frozen-thawed spermatozoa in ocelots (*Felis pardalis*). *Journal of Reproduction and Fertility*, **106** (1): 87–94.
- Swanson W F. 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology*, **66** (1): 49–58.
- Tipkantha W, Thuwanut P, Maikaw U, Thongphakdee A, Yapila S, Kamolnorranath S, Siriaronrat B, Comizzoli P, Chatdarong K. 2017. Successful laparoscopic oviductal artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*) in thailand. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, **48** (3): 804–812.
- Vansandt L M, Bateman H L, Miller A G, Herrick J R, Moresco A, Gonzalez R, Iwaniuk M E, Swanson W F. 2021. Cross-species efficacy of a chemically-defined, soy lecithin-based cryomedium for semen banking in imperiled wild felids. *Theriogenology*, **159**: 108–115.
- Veprintsev B N, Rott N N. 1979. Conserving genetic resources of animal species. *Nature*, **280** (5724): 633–634.
- Wang D H, Liu Y L, Cai Z G, An J H, Lan J C, Chen J S, Li Y, He L, Zhang Y, He P, Zhang Z H, Yie S M, Hou R. 2020. Effects of extender type on the quality of post-thaw giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) semen. *Cryobiology*, **94**: 95–99.

- Wildt D E, Comizzoli P, Pukazhenthi B, Songsasen N. 2010. Lessons from biodiversity – the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. *Molecular Reproduction and Development*, **77** (5): 397–409.
- Wildt D E, Rall W F, Critser J K, Monfort S L, Seal U S. 1997. Genome resource banks. *Bioscience*, (10) : 689–698.
- Xie Z. 2019. The 2019 international studbook for giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *Chinese Association of Zoological Gardens*.
- Zhang M Y, Zhang X H, Zhang P, Liu Y L, An J H, Wang D H, Cai Z G, Hou R. 2021. Natural reproductive performance is associated with captive management in adult male giant pandas. *Applied Animal Behaviour Science*, **240** (4): 105353.
- Zhang Z H, Wei F W. 2006. *Giant Panda ex-situ Conservation Theory and Practice*. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 胡锦涛. 1990. 大熊猫生物学研究与进展. 成都: 四川科学技术出版社, 1–8.
- 沈富军, 张志和, 李光汉, 张安居. 2002. 圈养大熊猫的系谱分析. *遗传学报*, **29** (4): 307–313.
- 张志和, 魏辅文. 2006. 大熊猫迁地保护理论与实践. 北京: 科学出版社.