

使用冷藏精液进行大熊猫 (*Ailuropoda melanoleuca*) 人工授精

黄炎 李德生 张和民 杜军 张贵权 魏荣平 LAURA McGeehan¹

JOGAYLE Howard² 汤纯香 王鹏彦

(中国保护大熊猫研究中心 四川汶川 623006)

(¹圣地亚哥动物园协会 圣地亚哥 美国)

(²美国斯密史苏尼安国家公园保护研究中心)

摘要 使用在4℃冷藏24 h和48 h的精液对5岁的雌性大熊猫妃妃进行了人工授精,以保持圈养大熊猫的遗传多样性. 供精者乐乐是一只患皮肤癌的雄性大熊猫,睾丸体积为 $(386.1 \pm 214) \text{ cm}^3$,在2000-02-23~05-11期间,4次人工采精:刺激电压5~8 V,射精电压5~8 V,每次采精量 $(3.2 \pm 1.2) \text{ mL}$,精子密度为 $(1208.5 \pm 564.9) \times 10^6/\text{mL}^{-1}$,每次精子总量 $(3908.3 \pm 2546.6) \times 10^6$,精液平均活力为 $84.8\% \pm 4.1\%$,活率为 $87.8\% \pm 5.2\%$,运动状态为 2.9 ± 0.25 ,畸形率为 $28.3\% \pm 11.1\%$,平均顶体正常率为 $96\% \pm 1\%$,pH值为 7.9 ± 0.3 . 乐乐的精液用TEST稀释后,在4℃冷藏24 h、48 h和72 h后,精子活力分别是65%、58%和47%,精子的活率分别为73%、73%和68%. 用酶免法对雌兽妃妃尿液中雌激素的检测,发现妃妃的雌激素在发情前期开始增加,在发情前期的最后一天达到最大峰值,在发情期(4月3日~5日)迅速下降到正常值,进行人工授精的最佳时间是在雌兽尿液中的雌激素达到最大峰值后的48~72 h之间. 妃妃在2000-08-10顺利地产下一仔,雌性,妊娠期127 d,初生幼仔179.3 g. 图1 表3 参19

关键词 大熊猫; 人工授精; 电刺激采精; 低温冷藏; 雌激素; 遗传多样性

CLC Q959.838 : Q954.44

ARTIFICIAL INSEMINATION OF A GIANT PANDA WITH COOLED SEMEN: AN EFFORT TO PROMOTE GENETIC DIVERSITY IN A CAPTIVE POPULATION

HUANG Yan, LI Desheng, ZHANG Hemin, DU Jun, ZHANG Guiquan, WEI Rongping,

LAURA McGeehan¹, JOGAYLE Howard², TANG Chunxiang & WANG Pengyan

(Conservation and Research Center for Giant Panda, Wolong Nature Reserve, Wenchuan 623006, China)

(¹The Zoological Society of San Diego, San Diego, USA)

(²Conservation & Research Center, Smithsonian National Zoological Park, Front Royal, VA, USA)

Abstract Artificial insemination of a 5-year-old giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) was carried out using semen stored for 24 h and 48 h at 4℃, and the procedure took place at Conservation and Research Center for Giant Panda in Wolong Nature Reserve, China. The procedure was needed to promote an increase in genetic diversity among a captive population of giant panda. Le Le, the semen donor who was 16.5 years old, suffered from skin cancer and passed away on Jun 5, 2000. Le Le became a father 66 d after he died. Though he suffered from skin cancer, he still produced good quality semen. Semen was collected from him 4 times via electroejaculation between Feb 23, 2000 and May 11, 2000. Several variables were measured during this period: body weight was 105 kg, testes volume was $(386.1 \pm 214) \text{ cm}^3$, semen volume was $(3.2 \pm 1.2) \text{ mL}$, sperm concentration was $(1208.5 \pm 564.9) \times 10^6/\text{mL}^{-1}$, total number of sperm per ejaculation was $(3908.3 \pm 2546.6 \times 10^6)$, sperm motility was $84.8\% \pm 4.1\%$, percent live $87.8\% \pm 5.2\%$, speed of progression was 2.9 ± 0.25 , abnormal sperm count was $28.3\% \pm 11.1\%$, normal acrosome count was

96% $\pm$ 1% , and pH was 7.9 $\pm$ 0.3. A dilution of one part semen and two parts TEST was prepared. Diluted semen was stored at 4°C in a refrigerator. Semen motility was measured at 24 h, 48 h and 72 h, and motility was 65% , 58% and 47% , respectively. Percent live of sperm was measured at the same intervals, and the percent live was 73% , 73% and 68% , respectively. Urinary excretion of oestrogens by a female panda was monitored by enzyme immunoassay during breeding season. The excretion of oestrogens by the female increased and then peaked during the proceptive period, after which the oestrogen level declined precipitously, signaling female receptivity for mating. Artificial inseminations were carried out at 48 h and 72 h after the peak excretion of oestrogens. The female panda gave birth to a female infant on Aug 10, 2000. The gestation period was 127 d. The body weight of new baby was 179.3 g. Fig 1, Tab 3, Ref 19

Keywords giant panda; artificial insemination; electroejaculation; cooled semen; oestrogens; genetic diversity

CLC Q959.838 : Q954.44

使用人工授精技术繁殖大熊猫首先在北京动物园获得成功^[1,2],并相继在中国保护大熊猫研究中心、上野动物园、马德里动物园、成都动物园也获得了成功^[3,4,5,6],提高了圈养大熊猫的繁殖率.但人工授精与自然交配相比,受孕率一般都较低,只有 33%^[6].用于人工授精的精液主要是鲜精和冻精,很少使用冷藏精液(4°C).中国保护大熊猫研究中心在运用人工授精提高圈养大熊猫繁殖率的同时,也注重遗传多样性的保护,于 2000-02-23 日~05-11 对患有皮肤癌的雄性大熊猫乐乐(305)进行了 4 次电刺激采精,用冷藏 24 h 和 48 h 的乐乐精液,对 5 岁的雌性大熊猫妃妃进行两次人工授精,现将研究结果报告如下:

1 材料和方法

1.1 实验动物

大熊猫乐乐(305):16.5 岁,♂,1983 年生于宝兴,体重 105 kg,患皮肤癌 3 年,睾丸发育好,质地正常.于 2000-02-23 ~ 05-11 人工采精,2000-06-05 死亡.

大熊猫妃妃(432):5 岁,♀,健康,体重 105 kg,1995-08-16 生于卧龙繁殖场,母系 1 号,父系盼盼.1998 年开始出现发情表现.

1.2 精液采集、评估和冷藏

大熊猫用氯胺酮 6~8 mg/kg,辅以龙朋 0.3~0.5 mg/kg 进行麻醉保定.直肠法电刺激采精的方法见文献[7].电极棒直径 26 mm,长 300 mm,3 个长条电极长 65 mm,高 3 mm,呈 45 度,90 度和 135 度排列,使用 PTC 220 VAC 电采精器(P. T. Electronics, 11241, S. E. 362nd, Boring, Oregon 97009, USA),刺激电压从 4 V 开始,射精电压 6~7 V,根据后肢收缩的情况,调节电极棒,每次刺激时间 2 s,两次刺激的

间隔时间为 3 s,电压达到 6 V(100 mA)时,阴茎轻度勃起,刺激 2 次便有精液射出,在 10 次刺激中射精 2 次,用 7 V(130 mA)刺激 10 次也射精 2 次,采精时间 4 min.

把采集的精液放入 37°C 的水浴箱中,测量精液的体积,用显微镜对精液的质量和形态学进行分析、评估.精子质量用精子的活力(motility)、活率(percent live)、运动状态(status)、pH 值、顶体的正常率(normal apical ridge)和精子形态学(morphology)来进行评价.精液的评估方法见文献[7].

把乐乐新鲜精液按 1:2 的比例用 TEST(#9971, Irvine Scientific, 2511 Daimler Street, Santa Ana, CA 92705-5588)稀释,保存于 4°C 冰箱中,在冷藏 24、48 和 72 h,每次取少量精液检测活力、活率和运动状态.

1.3 人工授精时间的选择

人工授精的时间以雌兽的发情行为、雌激素的水平和阴道上皮细胞的角化率来综合评价,选择人工授精的最佳时间.

雌性大熊猫在发情期间行为有明显的变化,发情初期活动量增加,减食,擦阴,咩叫,阴门开始红肿;发情高峰期擦阴频率减少,咩叫频率增加,嬉水,倒退,翘尾,接近雄体和露阴,如果放对,能进行自然交配.选择高峰期的最后 1 天和第 2 天进行人工授精.

在大熊猫发情季节每天收集妃妃的新鲜尿液,分装后于 -20°C 保存待测.用在生理盐水中浸湿的棉签插入雌兽阴门 50~60 mm,转动棉签后迅速取出,涂片后用 Pap 染液染色,片干后用显微镜读片.

1.4 人工授精

输精时先把雌熊猫麻醉保定(方法同前),保持仰卧姿势.把冷藏精液放入 37°C 水浴中保温,10 min 后取少量精液进行评估.

使用透明玻璃制成的量筒状(无底)开腔器,插入阴道端,端口平滑,外径 25.5 mm,内径 23 mm,长度为 125 mm,漏斗端外径 68 mm. 输精管使用不锈钢金属管,长 300 mm,内径 1 mm,外径 3.5 mm,前端呈光滑的圆头,外径是 5.5 mm,后端是插注射器的接口.

进行人工授精时,在消毒的开腔器前端涂抹少量润滑剂或蛋清,缓慢插入尿道生殖前庭,插到底部时,使用内窥镜的光源,可观测到许多皱褶,用输精导管在皱褶中轻轻试插,可找到两个孔,上方的孔是尿道,下方的开口是阴道,有的个体两个孔是并排的,最好使用两根输精管分别插入尿道和阴道,其中一个孔可以抽出尿,另一个就是阴道. 然后,用在 37℃ 恒温箱中保温 5 min 的消毒注射器吸取精液,迅速通过输精

导管注入阴道内,把开腔器和输精管取出后,马上把熊猫的臀部抬高 500 mm,保持 5 min.

2 研究结果

2.1 乐乐精液品质评估

乐乐平均睾丸体积为 $(386.1 \pm 214) \text{ cm}^3$,刺激电压 3~8 V,射精电压 5~8 V,平均每次采精量为 $(3.2 \pm 1.2) \text{ mL}$,精子密度为 $(1\,208.5 \pm 564.9) \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$,每次采精总量为 $(3\,908.3 \pm 2\,546.6) \times 10^6$,精液平均活力为 $84.8\% \pm 4.1\%$,活率为 $87.8\% \pm 5.2\%$,运动状态为 2.9 ± 0.25 ,畸形率为 $28.25\% \pm 11.1\%$,顶体正常率为 $96\% \pm 1\%$,pH 值为 7.9 ± 0.3 (见表 1).

表 1 大熊猫乐乐的精液评估
Table 1 Testes size and semen assessment of Le Le

采精次数 Times for collecting semen	1	2	3	4	平均值 Average value	方差 Variance
日期 Date	2000-02-23	2000-04-03	2000-04-29	2000-05-11		
睾丸体积 Testes volume (V/cm^3)	629.9		299.25	229.19	386.1	214
采精体积 Semen volume(V/mL)	4.5	3.8	2.9	1.7	3.2	1.2
精子密度 Sperm concentration($N/10^6 \text{ mL}^{-1}$)	664	2 000	1 130	1 040	1 208.5	565
精子总数 Total sperm($N/10^6$)	2 988	7 600	3 277	1 768	3 908.3	2 546.6
活力 Sperm motility ($r/\%$)	90	80	85	84	84.8	4.1
活率 Survival rate ($r/\%$)	90	80	90	91	87.8	5.2
运动状态 Speed of progression	2.5	3	3	3	2.9	0.25
精子畸形率 Abnormal sperm count ($r/\%$)	37	12	32	32	28.3	11.1
顶体正常率 Normal acrosome count ($r/\%$)	95	97			96	1
pH	7.9	8.1	7.5	8.1	7.9	0.3

把 2000-04-03 采的鲜精用 TEST 1:2 稀释,在 4℃ 的环境冷藏,在 24 h 和 48 h、72 h 观察精子的活力、活率和运动状态(表 2).

表 2 冷藏精液的活力、活率和运动状态
Table 2 Assessment of the stored semen at 4℃

时间 Time	0 h	24 h	48 h	72 h
活力 Motility($r/\%$)	80	65	58	47
活率 Survival rate($r/\%$)	80	78	73	68
运动状态 Speed of progression	3	2	2	1.5

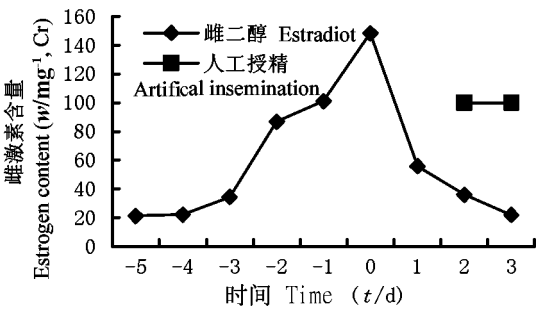


图 1 雌性大熊猫妃妃尿液中雌激素的变化
Fig. 1 Urinary excretion of estrogen during Fei Fei's estrus

2.2 人工授精的时间

妃妃在 2000 - 03 - 24 开始擦阴,少量咩叫,3 月 26 日咩叫频率增加,阴门粉红并开始减食,3 月 28 日出现手淫和戏水,4 月 3 日~5 日为发情高峰期,阴门红肿向外翻,频繁地咩叫和手淫,偶有翘尾,对雄兽有兴趣,4 月 6 日,阴门变白,仍有少量咩叫和手淫行为.

妃妃尿液中的雌激素水平在 3 月 27 日和 28 日是 21.44 ng/mg,Cr 和 22.21 ng/mg, Cr,从 3 月 30 日和 31 日开始增加,达到 34.54 ng/mg, Cr 和 86.82 ng/mg, Cr,4 月 2 日达到最高水平 148.36 ng/mg, Cr,4 月 3 日开始下降,为 55.9 ng/mg, Cr,4 月 5 日回到初始水平 22 ng/mg, Cr(图 1).

在妃妃的激素水平达到最高峰(4 月 2 日)后的 48 h(4 月 4 日)和 72 h(4 月 5 日)进行了两次人工授精.妃妃的阴道上皮细胞的角化率分别是 78%(4 月 4 日)和 88%(4 月 5 日).

2.3 人工授精

妃妃在 2000 - 03 - 24 开始发情.2000 - 04 月 - 04 ~05 用乐乐冷藏精液进行了 2 次人工授精,两次输精情况见表 3.精液品质见表 2 的 24 h 和 48 h.两次人工授精的时间分别为 32 min 和 34 min.2000 - 08 - 10 妃妃顺利地产下一仔,雌性,妊娠期 127 d,初生幼仔 179.3 g.

表 3 人工输精情况

Table 3 Artificial insemination for Fei Fei at Wolong

输精日期 Date	输精量积 Volume	输精子数 Number	稀释倍数 Dilution	输精深度 Depth
2000-04-04	3 mL	2000 × 10 ⁶	×3	18 cm
2000-04-05	3 mL	1000 × 10 ⁶	×6	18 cm

3 讨论

尽管乐乐患有皮肤癌,但它的生殖系统功能却很正常.从 2 月 22 日~5 月 11 日的 80 d 里,用标准的电刺激采精的方法,都从乐乐采到了质量很好的精液.用 TEST 稀释后,在 4℃ 下保持 72 h 后活力仍有 47%,活率 68%,与鲜精相比,原来活动的精子还有 85% 仍然存活,完全可以用于人工授精.如果加入一定浓度的咖啡因,可以提高精子的活力.使用这种冷藏精液的方法,可以长途运送精液,进行各饲养单位的种源交流,减少动物的长途运输.

由于大熊猫是濒危的珍稀动物,实验材料很难获得,雌性大熊猫的排卵时间和机理至今都不太清楚.

家猫是通过交配来诱导排卵的,进入发情期的雌猫与雄猫频繁交配,平均每 h 交配 1 次(在 36 h 内交配 36 次),血液中的 LH 含量在 8 h 内由小于 4 ng/mL 增加到大于 70 ng/mL,然后在 20 ~ 24 h 内逐渐下降,LH 的骤增使卵母细胞成熟并排卵,如果只发生了一次交配,血液中的 LH 含量不会增加,也不会排卵(Wildt, Brown & Swanson,1999). 本研究表明,大熊猫与家猫不同,只要有发情表现的雌性大熊猫,即使没有交配也会排卵,排卵的时间在发情期.发情典型和发情期短(2 ~ 3 d)的雌兽的放对和人工授精的时间比较容易判断,但对发情期长(4 ~ 7 d)和发情不典型的雌兽单凭行为是很难判断人工授精的时间.

通过对雌兽尿液中雌激素的检测,可以帮助我们确定人工授精的时间.有发情表现的雌性成兽在发情期均有一个尿雌激素的最大峰值,而未发情的就无此峰值(曾国庆等,1984). Bonney 等(1982)用放射免疫法对 1 只雌性大熊猫尿液中雌激素在两个发情期的研究表明,雌激素的分泌量在发情前期开始增加并达到峰值,在发情期下降.用酶免法对妃妃尿液中雌激素的检测,也发现雌激素在发情前期开始增加,在发情前期的最后一天达到最大峰值,在发情期(4 月 3 日~5 日)迅速下降到正常值,这与 Bonney 等的研究结果一致.因为在动物的排卵期间使用绿胶酮或气体麻醉动物,可能导致动物停止排卵(Wildt, 1998),进行人工授精的最佳时间是在雌兽尿液中的雌激素达到最大峰值后的 48 ~ 72 h 之间.

由于圈养大熊猫种群中,能自然交配的雄性大熊猫的数量很少(Lindburg,1998),人工授精的受孕率低(叶志勇,1991),造成了少数雄性大熊猫繁殖了大部分后代的局面.以前,进行人工授精,是因为雌性大熊猫发情不典型或没有能自然交配的公兽.为了提高大熊猫的繁殖率,我们对妃妃进行人工授精的主要原因,是保持圈养大熊猫种群的遗传多样性,让当时已患皮肤癌的乐乐能留下后代,以增加圈养大熊猫的遗传多样性.乐乐在 2000-06-05 死亡,但在它死亡后的 66 d 后却有了后代.

参考文献

1 Liu WX(刘维新), Ye JQ(叶掬群), Li CZ(李成忠), Liao GX. Artificial insemination experiment on the giant panda. *Chin Zoo Ann*(中国动物园年刊). 1979,2:20 ~ 24

2 Liu WX(刘维新). Artificial insemination on giant pandas. *Bull Biol*(生物学通报). 1981,1:64

3 Zhang HM(张和民), Wang PY(王鹏彦), Zhang GQ(张贵

- 全), Wei RP(魏荣平). Advances in conservation and research technology for captive and wild pandas in Wolong. *J Sichuan Zool*(四川动物). 2000,**19**(1):35~38
- 4 Moore HDM, Bush M, Celma M. Artificial insemination in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *J Zool Lond*. 1984, **203**:269~278
- 5 Masui M, Hiramatsu H, Nose N. Successful artificial insemination in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) at Ueno Zoo. *Zoo Biol*. 1989,**8**:17~26
- 6 Ye ZY(叶志勇), He GX(何光昕), Zhang AJ(张安居), Song YF(宋云芳), Xu QM(徐启明), Feng WH(冯文和). Studies on the artificial pollination method of giant panda. *J Sichuan Univ (Nat Sci)*. 1991,**28**:50~53
- 7 Huang Y(黄炎), Li DS(李德生), Zhang HM(张和民), Du J(杜军), Zhang GQ(张贵全), Wang PY(王鹏彦), Howard JG, Spindler R, Durrant B, Olson MA. Electroejaculation and semen cryopreservation in giant panda. *J Sichuan Teachers Coll (Nat Sci)* [四川师范学院学报(自然科学版)]. 2000,**21**(3):238~243
- 8 Huang Y(黄炎), Li DS(李德生), Du J(杜军), Wang PY(王鹏彦), Zhang HM(张和民), Durrant B, Howard JG. Cryopreservation experiment on sperm of the giant panda. *Chin J Veter Med*(中国兽医杂志). 2000,**26**(2):13~14
- 9 Horward JG, Byers AP, Brown JL, Barrent SJ, Evens MZ, Schwartz RJ, Wildt DE. Successful ovulation induction and laparoscopic intrauterine artificial insemination in the clouded leopard (*Neofelis nebulosa*). *Zoo Biol*. 1996,**15**:55~69
- 10 Horward JG. Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In: Fowler ME ed. *Zoo and Wild Animal Medicine III*. Philadelphia: W. B. Saunders Co, 1993
- 11 Platz CC, Wildt DE, Howard JG, Bush M. Electroejaculation and semen analysis and freezing in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*). *J Reprod Fert*. 1983,**67**:9~12
- 12 Wildt DE, Brown JL, Swanson WF. Encyclopedia of Reproduction. Vol 1. Academic Press, 1999. 497~510
- 13 Monfort SL, Dahl KD, CzeKala NM, Stevens L, Bush M, Wildt DE. Monitoring Ovarian function and pregnancy in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) by evaluating urinary bioactive FSH and steroid metabolites, *J Reprod Fert*. 1989, **85**:203~212
- 14 Zeng GQ(曾国庆), Meng ZB(孟智斌), Jiang GT(蒋广泰), He QX(何光昕), Xu QM(徐启明). The relationship between estrogen concentration and estrous behaviors during the estrous cycle of the giant panda. *Acta Zool Sin*(动物学报). 1984,**30**(4):324~330
- 15 Zeng GQ(曾国庆), Jiang GT(蒋广泰), Yang KQ(杨克勤), Liu WX(刘维新), Xie Z(谢钟), Liu NL(刘农林). Study on reproductive physiology for the giant panda. *Acta Zool Sin*(动物学报). 1990,**36**(1):15~20
- 16 Lindburg DG, Huang XM(黄祥明), Huang SQ(黄世强). Reproductive Performance of Male Giant Panda in Chinese Zoos, Proceeding of the International Symposium on the Protection of the Giant Panda. Chengdu: Sichuan Publishing House of Science and technology, 1998. 65~71
- 17 Bonney RC, Wood DJ, Kleiman DG. Endocrine correlates of behavioural oestrus in the female giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) and associated hormonal changes in the male. *J Reprod Fert*. 1982,**64**:209~215
- 18 Baker HWG, Ng FLH, Liu DY. Handbook of *in vitro* Fertilization: Preparation and Analysis of Semen for IVF/GIFT. CRC Press, 1993. 33~56
- 19 Zhang AJ(张安居), Ye ZY(叶志勇), He GX(何光昕), Xu QM(徐启明), Song YF(宋云芳), Feng WH(冯文和). Studies on conception effect of the frozen semen in giant panda. *J Sichuan Univ(Nat Sci)*. 1991,**28**:54~59