

张柳明, 王旭洋, 江才雨, 等. 稀释比例对绵羊精子活率、活力、运动速率、质膜完整率和顶体完整率的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (6): 15-21.

ZHANG L M, WANG X Y, JIANG C Y, et al. Effect of dilution ratio on total spermatozoa motility, progressive motility, kinematic parameters, plasma membrane integrity and acrosome integrity in sheep [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (6): 15-21.

稀释比例对绵羊精子活率、活力、运动速率、 质膜完整率和顶体完整率的影响

张柳明, 王旭洋, 江才雨, 孙宇轩, 王健, 孙晓梅, 李拥军*

(扬州大学动物科学与技术学院/江苏省动物遗传繁育与分子设计重点实验室, 江苏 扬州 225009)

摘要: 旨在研究 15 °C 条件下保存绵羊精液的最适宜稀释比例, 获得较好的精液保存效果。试验分别将精液按照 1:1、1:4、1:9、1:14、1:19 和 1:24 进行稀释保存, 在保存过程中检测精子的活率、活力、直线速率 (VSL)、曲线速率 (VCL)、路径速率 (VAP)、侧摆幅度 (ALH)、移动角度 (MAD)、质膜完整率和顶体完整率。结果显示, 保存 3~6 d, 1:9 稀释后的精子活率显著高于其他稀释比例 ($P<0.05$); 保存 1~5 d, 1:4 和 1:9 稀释后的精子活力显著高于其他稀释比例 ($P<0.05$); 保存 3~5 d, 1:4 和 1:9 稀释后的精子质膜完整率和顶体完整率显著高于其他稀释比例 ($P<0.05$); 保存 3~6 d, 1:4 和 1:9 稀释后的精子 VCL、VAP 和 ALH 显著高于其他稀释比例 ($P<0.05$), 但两组之间差异不显著 ($P>0.05$)。因此, 在本试验条件下, 15 °C 保存绵羊精液最合适的稀释比例是 1:9, 过高和过低的稀释比例均不利于绵羊精液保存。

关键词: 绵羊精液; 稀释比例; 15 °C; 精子活力

中图分类号: S826 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)06-0015-07

Effect of dilution ratio on total spermatozoa motility, progressive motility, kinematic parameters, plasma membrane integrity and acrosome integrity in sheep

ZHANG Liuming, WANG Xuyang, JIANG Caiyu, SUN Yuxuan, WANG Jian, SUN Xiaomei, LI Yongjun*

(College of Animal Science and Technology/Jiangsu Province Key Laboratory for Animal Genetics & Molecular Breeding, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: This study was to determine the optimal dilution ratio for preserving sheep semen at 15 °C and to achieve a better semen preservation effect. The semen samples were diluted at ratios of 1:1, 1:4, 1:9, 1:14, 1:19, and 1:24, respectively. Then, total spermatozoa motility, progressive motility, straight line velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), average path velocity (VAP), amplitude of lateral head displacement (ALH), average motion degree (MAD), plasma membrane integrity, and acrosome integrity of the samples were measured during preservation. The results showed that the total spermatozoa motility in the 1:9 dilution group was significantly ($P<0.05$) higher than that in the other dilution ratio groups, for 3-6 days of preservation. The progressive spermatozoa motility in the 1:4 and 1:9 dilution groups was significantly higher than those in the other dilution ratio groups, for 1-5 days of preservation ($P<0.05$). During 3-5 days of preservation, the plasma membrane integrity and acrosome integrity were significantly higher in the 1:4 and 1:9 dilution groups, compared with the other dilution groups ($P<0.05$). During 3-6 days of preservation, VCL, VAP, and ALH in the 1:4 and 1:9 dilution groups were significantly higher than those in the other dilution ratio groups ($P<0.05$). However, the difference between the two groups was not significant ($P>0.05$). Therefore, based on the conditions of this experiment, the most appropriate dilution ratio for preserving sheep semen at 15 °C was 1:9. Both excessively high and low dilution ratios were found to be unfavorable for sheep semen preservation.

Keywords: sheep semen; dilution ratio; 15 °C; progressive spermatozoa motility

收稿日期: 2023-12-19; 修回日期: 2024-03-20

基金项目: 江苏现代农业产业技术体系建设项目 (JAST [2023] 448)

第一作者: 张柳明, 男, 博士研究生

* 通信作者: 李拥军, 博士, 教授, 研究方向为动物繁育与养羊生产, E-mail: yzliyongjun@163.com。

人工授精是指人工采集精液并将处理后的精液输到发情母畜生殖道的良种繁育技术^[1-2]。人工授精技术可以提高优良公畜精液利用率、提高母畜受孕率、防止部分生殖道疾病的传播等^[3-5]。人工授精技术的前提是保证良好的精液质量,而影响精液质量的因素很多,如精液保存方式、稀释液成分、采精频率和稀释比例等^[6-7]。

精液稀释可以扩大精液量,为精子提供营养物质、合适的渗透压和 pH 值等,延长精液的保存时间,能更有效地用于人工授精^[8]。精液保存过程中,精子代谢会不断消耗营养物质,产生代谢废物和氧化因子,影响精液保存效果。因此,当精子密度过高时,稀释液中的缓冲物质和抗氧化物质不能长时间维持 pH 值的稳定和氧化还原平衡^[9]。当精子密度过低时,精浆中的有益物质如天然抗氧化剂、小分子蛋白、脂肪酸类物质等的浓度降低,从而降低了对精子的保护能力,即发生稀释效应,缩短了精液的有效保存时间^[10]。如果稀释比例过高,精子密度和有效精子数都会降低,同时,由于绵羊子宫颈的特殊螺旋形构造,随着输精剂量的增加,会加剧精子从宫颈回流,降低妊娠率^[11-12]。李助南等^[13]在山羊精液的研究中表明,2~5 倍稀释保存的精液质量最佳;郝冠英^[14]在绵羊精液的研究中,采用了 1:20 的稀释比例进行精液保存;Eslami 等^[15]将绵羊精液稀释 5 倍保存进行研究;Bhalothia 等^[16]在绵羊精液的研究中,采用了 10 倍稀释保存。研究报道中采用的精液稀释比例和保存效果各不相同,因此,探究合适的稀释比例对精液保存和人工授精非常重要。

在生产实践中,大多采用不含抗冻保护剂的稀释液对精液进行稀释保存和人工授精。Zhang 等^[17]关于绵羊精液的研究表明,在 15 °C 保存条件下,该稀释液不需要添加卵黄和甘油等抗冻保护剂,即可达到较好的保存效果,有着稀释液配方简便、易于操作等优点,适合在生产实践中推广应用。因此,本研究在选择该稀释液和保存温度的基础上通过对精子活率、活力、运动速率、质膜完整率和顶体完整率的检测,比较了不同稀释比例对 15 °C 保存公羊精液的作用效果,旨在为改进绵羊精液保存技术提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

Tris (A100826)、果糖 (A100226) 和磷酸氢二钠 (A610404) 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,青霉素钠 (S17030)、链霉素硫酸盐 (S17058)、柠檬酸 (S30039) 和柠檬酸钠 (S11111)

均购自源叶生物科技有限公司,姬姆萨染色液 (G1015) 购自北京索莱宝科技有限公司。超纯水仪 (YK-RO-B-15L) 购自舒活泉(厦门)智能科技有限公司,恒温箱 (PYX-280S-C) 购自科力仪器有限公司,全自动精子分析仪 (ML-608JZ II) 购自南宁松景天伦生物科技有限公司,奥林巴斯 (CX31) 显微镜购自日本奥林巴斯株式会社,恒温水浴锅 (HH-2) 购自荣华仪器制造有限公司。

1.2 精液采集

本试验使用的 3 只公羊(购自江苏乾宝牧业有限公司)饲养在扬州大学实验羊场,按照实验羊场的规章制度饲养管理。假阴道法采集 3 只公羊的精液,每周 2 次。将采集的精液样本放在 37 °C 的保温杯中,在 30 min 内带回实验室。使用全自动精子分析仪 (CASA) 对采集的精液样本进行评定,正常精液标准:精液体积为 0.5~1.5 mL,精子密度 $\geq 2.5 \times 10^9$ 个/mL,活率 $\geq 80\%$,畸形率 $\leq 15\%$ 。将检测合格的精液样本混合,以消除个体差异,用于后续试验。

1.3 精液稀释

根据褚长江^[18]的研究,在 15 °C 保存绵羊精液时,所使用的稀释液由 3.07 g Tris、1.64 g 柠檬酸、2 g 果糖、50 000 IU 青霉素钠和链霉素硫酸盐溶于 100 mL 超纯水中构成。将检测合格的精液混合均匀后分装到 2 mL 离心管中,分别按照 1:1、1:4、1:9、1:14、1:19 和 1:24 进行等温稀释。在精液 15 °C 保存过程中,针对相关指标每隔 24 h 进行检测。

1.4 精子活率、活力及运动性能检测

从不同稀释比例的精液中分别取 20 μ L,用 Tris 稀释液统一稀释至 40 倍,放置在 37 °C 水浴锅孵育 3 min。孵育结束后,取 1.4 μ L 在红宝石精子计数板 (YA-1, 10 μ m, 南京宇成光学) 上,放置在 37 °C 恒温台。利用 CASA 系统在 100 \times 的相差显微镜下 (ML-800, 松景天伦生物科技有限公司) 测定精子活率,活力,直线速率 (VSL),曲线速率 (VCL),平均路径速率 (VAP),侧摆幅度 (ALH) 和移动角度 (MAD),所有视野合计至少 500 个精子。

1.5 精子质膜完整率检测

根据 Wang 等^[19]描述的低渗肿胀试验 (HOST) 来检测精子质膜的完整率,当精子处于低渗溶液时,水分子可通过质膜进入精子内,使质膜完整精子的体积增大而发生尾部弯曲。取 20 μ L 按不同稀释比例稀释保存的精液,用 Tris 稀释液统一稀释至 25 倍,取 10 μ L 精液并加入 100 μ L 低渗溶液(由 0.49 g 柠檬酸钠和 0.9 g 果糖溶解在 100 mL 超纯水中构成,其渗透压为 108 mOsm/L)。放置在 37 °C 水浴锅孵育至

少 30 min。孵育结束后,取 1.2 μL 于红宝石精子计数板上,使用奥林巴斯 CX31 显微镜 (400 \times) 观察其弯尾率,每次至少人工计数 200 个精子。

1.6 精子顶体完整率检测

根据 Shoaie 等^[20] 描述的姬姆萨染色法来检测精子顶体完整率,精子顶体区域富含各种顶体酶,当顶体完整时,姬姆萨染液会与各种酶结合从而染色。取 20 μL 按不同稀释比例稀释保存的精液,用 Tris 稀释液统一稀释至 25 倍,取 20 μL 精液进行涂片。在姬姆萨染色工作液 (用 1.42 mg/mL 的磷酸氢二钠溶液对姬姆萨染色液进行 1:9 稀释) 中染色 3 h,冲洗后自然晾干。使用奥林巴斯 CX31 显微镜 (400 \times) 进行观察,每次至少人工计数 200 个精子。

1.7 数据统计与分析

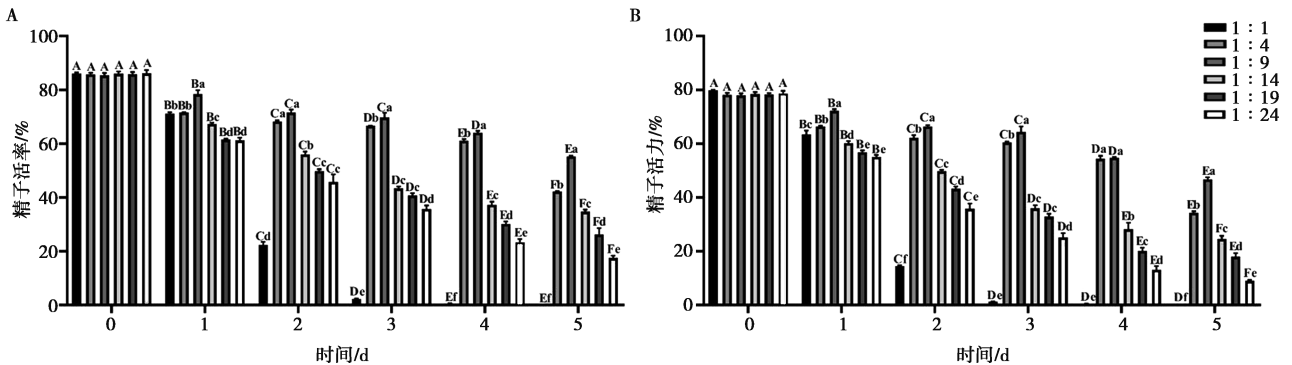
试验数据使用 SPSS 25.0 进行统计分析,结果以“平均值 \pm 标准差”表示。精子活率、活力、VSL、VCL、VAP、ALH、MAD、质膜完整率和顶体完整率均进行双因素重复测量方差分析,每个处理重复 3

次, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P > 0.05$ 表示差异不显著。

2 结果

2.1 不同稀释比例对 15 $^{\circ}\text{C}$ 保存的绵羊精子活率和活力的影响

如图 1 所示,1:1 稀释保存的精子活率和活力下降很快,且在 5 d 时,精子全部死亡;在 2~5 d 内,1:4 和 1:9 稀释保存的精子活率显著高于其他稀释比例 ($P < 0.05$);在 3~5 d 内,1:9 稀释保存的精子活率最高 ($P < 0.05$);在 4~5 d 内,随着稀释比例的增大,1:14、1:19 和 1:24 这 3 组的精子活率和活力逐渐降低 ($P < 0.05$);在 1~5 d 内,1:9 稀释保存的精子活力最高,且在 1~3 d 和 5 d 时,其显著高于其他各组 ($P < 0.05$);在 1~5 d 内,1:4 稀释保存的精子活力显著高于除 1:9 稀释外的各组 ($P < 0.05$)。



不同小写字母表示同一天不同稀释比例之间差异显著 ($P < 0.05$),不同大写字母表示同一稀释比例不同天之间差异显著 ($P < 0.05$),无字母或含相同字母则表示差异不显著 ($P > 0.05$),下同。

图 1 不同稀释比例对 15 $^{\circ}\text{C}$ 保存的绵羊精子活率 (A) 和活力 (B) 的影响

2.2 不同稀释比例对 15 $^{\circ}\text{C}$ 保存的绵羊精子运动性能的影响

如表 1 所示,1:1 稀释保存的精子 VSL、VCL、VAP、ALH 和 MAD 均下降很快;在保存 2~5 d 内,1:9 稀释保存的精子 VSL 高于 1:4 稀释比例组 ($P > 0.05$),且显著高于其他各组 ($P < 0.05$);在 2~5 d 内,随着稀释比例的增大,1:14、1:19 和 1:24 这 3 组的精子 VSL 逐渐降低,且在 3~4 d 内,1:19 稀释保存的精子 VSL 显著高于 1:24 组 ($P < 0.05$),在 4~5 d 内,1:14 稀释保存的精子 VSL 显著高于 1:19 组 ($P < 0.05$)。

在 2~5 d 内,1:4 和 1:9 稀释保存的精子 VCL、VAP、ALH 和 MAD 显著高于其他各组 ($P < 0.05$),但 2 组间差异不显著 ($P > 0.05$);保存 4 d 时,1:14 稀释保存的精子 VCL、VAP 和 ALH 显著高于 1:19 组 ($P < 0.05$);5 d 时,随着稀释比例的增大,1:14、1:19 和 1:24 这 3 组的精子 VCL、VAP 和 ALH 逐渐降低 ($P < 0.05$);在 3~4 d 内,随着稀释比例的增大,1:14、1:19 和 1:24 这 3 组的精子 MAD 逐渐降低,但差异不显著 ($P > 0.05$),在 5 d 时,1:14 稀释保存的精子 MAD 显著高于 1:24 组 ($P < 0.05$)。

表 1 不同稀释比例对 15 °C 保存的绵羊精子运动性能的影响

参数	保存时间/d	稀释比例					
		1 : 1	1 : 4	1 : 9	1 : 14	1 : 19	1 : 24
VSL/ ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	0	42.01±0.86 ^A	43.29±0.64 ^A	43.52±0.50 ^A	44.32±0.28 ^A	45.96±4.77 ^A	43.72±2.31 ^A
	1	38.40±2.43 ^A	41.88±0.77 ^{AB}	42.36±0.95 ^A	42.46±0.71 ^A	43.16±1.22 ^A	42.14±0.38 ^A
	2	26.60±0.61 ^{Bd}	40.27±1.37 ^{Cab}	41.60±2.13 ^{ABa}	35.08±2.40 ^{Bbc}	32.17±2.77 ^{Bed}	30.50±1.94 ^{Bed}
	3	13.71±2.06 ^{Ce}	34.84±0.85 ^{Dab}	38.37±1.92 ^{BCa}	31.40±2.30 ^{BCbc}	27.76±1.20 ^{BCc}	21.93±1.15 ^{Cd}
	4	5.06±0.04 ^{De}	35.60±0.12 ^{Da}	37.12±1.21 ^{BCa}	27.43±1.24 ^{CDb}	22.54±2.84 ^{Cc}	16.08±0.58 ^{Dd}
	5	0 ^{Ed}	34.55±0.40 ^{Da}	35.96±1.29 ^{CDa}	25.04±1.75 ^{Db}	20.79±2.06 ^{Cc}	17.19±0.66 ^{Dc}
VCL/ ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	0	75.31±1.86 ^A	77.78±1.61 ^A	74.13±2.57 ^A	75.61±0.92 ^A	73.81±2.69 ^A	76.82±1.70 ^A
	1	61.11±0.99 ^{Bc}	75.12±1.95 ^{Aa}	74.84±0.61 ^{Aa}	69.02±0.29 ^{Bb}	68.30±2.75 ^{Ab}	65.54±1.34 ^{Bb}
	2	57.82±0.46 ^{Bbc}	71.06±1.05 ^{Ba}	73.68±1.37 ^{ABa}	59.86±0.98 ^{Cb}	54.74±2.35 ^{Bc}	55.06±1.43 ^{Cc}
	3	28.16±5.12 ^{Cc}	66.12±1.91 ^{Ca}	64.19±3.15 ^{Ca}	51.36±0.78 ^{Db}	50.98±0.64 ^{BCb}	45.10±0.64 ^{Db}
	4	12.52±0.41 ^{Dd}	65.00±1.89 ^{CDa}	68.13±1.92 ^{BCa}	51.04±0.36 ^{Db}	44.07±1.97 ^{Cc}	40.74±0.14 ^{Ec}
	5	0 ^{Ee}	63.55±2.12 ^{Da}	65.82±1.93 ^{Ca}	51.24±0.59 ^{Db}	45.03±3.12 ^{Cc}	39.32±0.69 ^{Ed}
VAP/ ($\mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$)	0	53.26±1.31 ^A	55.00±1.26 ^A	52.42±1.81 ^{AB}	53.47±0.65 ^A	52.19±1.90 ^A	54.32±1.20 ^A
	1	43.21±0.70 ^{Bc}	54.53±1.14 ^A	52.92±0.44 ^{Aa}	48.81±0.20 ^{Bb}	48.29±1.95 ^{Ab}	46.34±0.95 ^{Bb}
	2	40.89±0.33 ^{Bbc}	50.25±0.74 ^{Ba}	52.10±0.26 ^{ABa}	42.33±0.70 ^{Cb}	38.71±1.66 ^{Bc}	38.93±1.02 ^{Cc}
	3	19.91±3.62 ^{Cc}	49.50±3.21 ^{BCa}	48.17±2.36 ^{BCa}	36.32±0.55 ^{Db}	36.05±0.45 ^{BCb}	31.89±0.46 ^{Db}
	4	8.85±0.29 ^{Dd}	46.76±1.35 ^{Ca}	47.25±0.66 ^{Ca}	36.09±0.26 ^{Db}	31.16±1.39 ^{Cc}	28.81±0.10 ^{Ec}
	5	0 ^{Ee}	43.59±1.50 ^{Da}	45.39±2.23 ^{Ca}	36.23±0.42 ^{Db}	31.85±2.20 ^{Cc}	27.80±0.49 ^{Ed}
ALH/ μm	0	22.06±0.54 ^A	22.59±0.47 ^A	21.71±0.75 ^A	22.15±0.27 ^A	21.62±0.79 ^A	22.50±0.50 ^A
	1	17.90±0.29 ^{Bc}	22.78±0.11 ^{Aa}	21.58±0.11 ^{ABa}	20.22±0.08 ^{Bb}	20.00±0.81 ^{Ab}	19.20±0.39 ^{Bb}
	2	16.94±0.14 ^{Bbc}	20.81±0.31 ^{Ba}	21.92±0.18 ^{Aa}	17.53±0.29 ^{Cb}	16.03±0.69 ^{Bc}	16.13±0.42 ^{Cc}
	3	8.25±0.50 ^{Cc}	20.96±1.62 ^{Ba}	18.80±0.92 ^{CDa}	15.04±1.23 ^{Db}	14.93±0.18 ^{BCb}	13.21±1.19 ^{Db}
	4	3.67±0.12 ^{Dd}	20.50±0.97 ^{BCa}	19.96±0.56 ^{BCa}	15.01±0.17 ^{Db}	13.19±0.91 ^{CDc}	11.93±0.04 ^{Ec}
	5	0 ^{Ee}	19.37±0.56 ^{Ca}	19.57±0.27 ^{Ca}	14.95±0.11 ^{Db}	12.91±0.58 ^{CDc}	11.51±0.20 ^{Ed}
MAD/ $^{\circ}$	0	119.98±9.05 ^A	121.97±9.00 ^A	107.17±5.53 ^A	116.44±11.63 ^A	124.50±14.62 ^A	140.70±11.22 ^A
	1	67.04±4.66 ^{Bc}	82.96±3.28 ^{Bb}	106.58±3.37 ^{Aa}	58.43±0.49 ^{Bcd}	47.45±3.88 ^{Be}	51.81±2.04 ^{Bde}
	2	22.70±1.39 ^{Cd}	81.11±0.86 ^{Ba}	82.93±3.05 ^{Ba}	57.69±2.73 ^{Bb}	45.07±0.41 ^{Bc}	44.20±1.97 ^{BCc}
	3	6.68±1.13 ^{De}	76.92±1.01 ^{Ba}	79.92±5.87 ^{Ba}	35.29±3.62 ^{Cb}	42.16±3.48 ^{BCb}	33.96±5.06 ^{CDb}
	4	6.47±3.36 ^{De}	72.53±7.38 ^{Ba}	73.39±7.02 ^{Ba}	31.70±1.64 ^{Cb}	29.11±3.03 ^{BCb}	32.59±1.26 ^{CDb}
	5	0 ^{Dd}	54.49±5.57 ^{Ca}	57.09±1.12 ^{Ca}	35.25±1.77 ^{Cb}	31.17±7.92 ^{BCbc}	21.90±0.85 ^{Dc}

注：同一行中不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。同一列中的不同大写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，无字母或含相同字母则表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 绵羊精子质膜完整率的影响

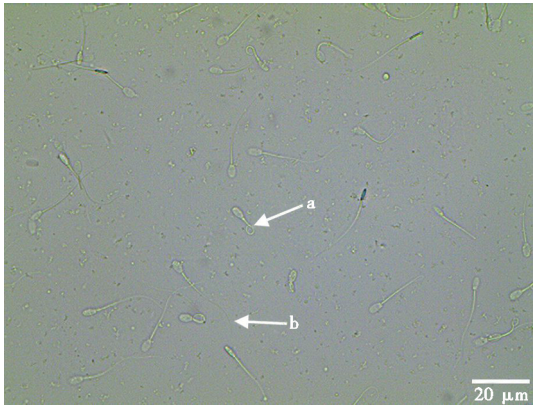
HOST 结果如图 2 所示，其中尾部卷曲的 a 代表质膜完整的精子，尾部不卷曲的 b 代表质膜受损的精子。如图 3 所示，在 2~4 d 内，1 : 1 稀释保存的精子质膜完整率显著低于其他各组 ($P < 0.05$)；在 1 d 和 3~4 d 内，1 : 4 和 1 : 9 稀释保存的精子质膜完整率显著高于其他各组 ($P < 0.05$)，但 2 组间差异不显著 ($P > 0.05$)；在 5 d 时，1 : 9 稀释保存的精子质膜完整率显著高于其他各组 ($P < 0.05$)；在 2~5 d 内，

1 : 24 稀释保存的精子质膜完整率显著低于除 1 : 1 稀释外的各组 ($P < 0.05$)。

2.4 绵羊精子顶体完整率的影响

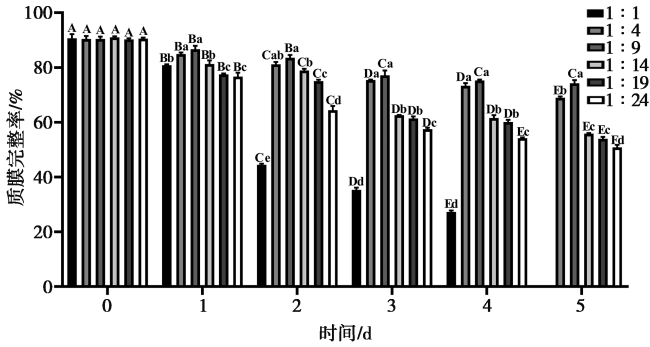
姬姆萨染色结果如图 4 所示，如果精子头部未染色或染色不均匀，则表示顶体不完整 (c)；如果精子头部呈均匀的紫红色，则表示顶体完整 (d)。如图 5 所示，在 1~4 d 内，1 : 1 稀释保存的精子顶体完整率显著低于其他各组 ($P < 0.05$)；在 4 d 时，1 : 9 稀释保存的精子顶体完整率显著高于其他各组

($P < 0.05$)，随着稀释比例的增加，1:14、1:19和1:24这3组的顶体完整率逐渐降低 ($P < 0.05$)。



a 表示质膜完整的精子，b 表示质膜受到损伤的精子。

图 2 低渗肿胀试验精子卷尾情况



第 5 天，1:1 稀释组精子全部死亡，无数据。下同。

图 3 不同稀释比例对 15 °C 保存的绵羊精子质膜完整率的影响



d 表示质膜完整的精子，c 表示质膜受到损伤的精子。

图 4 姬姆萨染色精子顶体

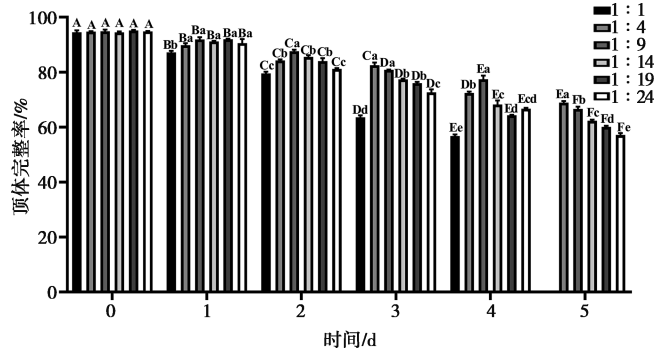


图 5 不同稀释比例对 15 °C 保存的绵羊精子顶体完整率的影响

3 讨论

精液稀释是在体外模拟精子的生存环境，通过添加合适的稀释液，为精子提供营养物质，降低其代谢，延长精子的存活时间，便于精液运输保存以及人工授精使用。精液进行适当的稀释后，可以增加精液量、提高精子的利用率并增加发情母畜的配种数量^[21-22]。因此，本研究比较了不同稀释比例对保存期间精子活率、活力、运动速率、质膜完整率和顶体完整率的影响，探究最适宜绵羊精液 15 °C 保存的稀释比例。

精子活率、活力和运动速率等指标是评价精液质量的关键指标，是保证精子能够顺利通过母畜生殖道的重要基础，与精子生育能力密切相关，在生产中对于能否授精有着重要影响^[23]。本研究中，随着保存时间的延长，1:14、1:19和1:24这3组稀释保存的精子活率和活力均显著下降。这可能是由于精液的高度稀释产生的稀释打击，导致精子活率快速下降，使精液保存质量降低^[24]。本研究中，0~3 d 内，1:1 稀释的精子活率和活力均显著下降。这可能是由于精子密度过高，代谢废物积累过多，影响了精液的 pH 值，稀释液中的缓冲物质无法维持平衡所致^[25-26]，还可能是因为精子代谢引起稀释液中糖类物质的大量消耗，不足以维持精子代谢的能量消耗，造成了精子活率的快速下降^[27]。本研究中，选择 Tris-果糖-柠檬酸稀释液，在 15 °C 保存 1 d、3 d 和 5 d 时，1:9 稀释保存的精子活率和活力均显著高于其他各组。这可能是合适的稀释比例保证了精液中缓冲物质和营养物质等的平衡。另外，其他更高稀释比例组随着稀释浓度的增加，精浆中缓冲物质被进一步稀释，使其对精子的保护作用下降^[10]。Catt 等^[28]在猪精液的研究中也发现，随着精浆添加量的减少，其冷冻保存效果逐渐降低。Rodriguez 等^[29]同样报道，精液质量与稀释比例密切相关，适当的稀释比例有利

于精子存活, 稀释比例过大或过小都会降低精液的保存效果。

精子的质膜和顶体对于精子的存活和发挥正常功能起着至关重要的作用, 是判断精子质量的重要标准。质膜是精子结构的基本组成部分, 精子的运动、获能、维持正常代谢、顶体反应以及精卵结合等都需要质膜的参与^[30]。本研究中, 随着保存时间的延长, 1:1 和 1:24 这 2 组稀释保存的精子质膜完整率显著下降, 1:4、1:14 和 1:19 这 3 组的精子质膜完整率在保存 0~3 d 内也显著降低, 1:9 稀释精子质膜完整率在 3~5 d 内没有显著降低, 同时 5 d 时, 1:9 稀释的精子质膜完整率显著高于其他各组。当质膜破损, 质膜完整率下降时, 可能会引起精子内的能量物质和生物酶等成分泄漏出来, 导致精子死亡^[31]。另外可能是因为 1:9 稀释的精子保存环境理化性质的相对稳定, 天然抗氧化物质、抑菌物质、缓冲物质以及营养物质能够更好地维持精子的正常代谢, 保持精子质膜的完整性^[32]。

精子顶体内含有大量与受精有关的酶类, 如透明质酸酶、放射冠穿透酶和顶体素等, 其主要作用是能够使精子穿透卵母细胞外层的卵丘、放射冠和透明带等保护层, 实现精卵结合, 是精子受精过程中非常重要的部分^[33-34]。本研究中, 在 3~5 d 内, 各稀释比例组的顶体完整率显著下降。同时, 1:9 稀释的精子顶体完整率在 4 d 时显著高于其他各组。这可能是因为稀释比例过低时, 会使精子的互相碰撞, 导致一定的物理损伤, 破坏精子顶体的完整性^[35]。赵同渊等^[36]研究也发现, 当稀释比例过高时, 精浆中的微量元素和维生素等物质的浓度也大幅度降低, 这些物质浓度的降低, 会引起精子沉聚, 进而破坏精子顶体的完整性。

综上所述, 1:9 是最适合绵羊精液 15 ℃ 保存的稀释比例, 按此稀释比例保存精液可有效提高精子结构的完整性并延长精子的存活时间, 精子浓度过高或过低都不利于绵羊精液的 15 ℃ 保存。

参考文献:

- MASON S J. Current review of artificial insemination in dogs [J]. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 2018, 48 (4): 567-580.
- YESTE M, RODRÍGUEZ-GIL J E, BONET S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm [J]. *Mol Reprod Dev*, 2017, 84 (9): 802-813.
- AVANZI B R, FARRÁS M C, MELO C M, et al. Efficiency of different cooling and storage systems for maintaining equine semen viability in a hot environment [J]. *Anim Reprod Sci*, 2006, 94: 152-154.
- WEISS R R, VIANNA B C, MURADÁS P R. Inseminação eméguas com sêmen in natura e diluído [J]. *Archives Vet Sci*, 2003, 8: 19-22.
- MACAN R C, CAMARGO C E, ZIELINSKI B L, et al. Timed artificial insemination in crossbred mares; reproductive efficiency and costs [J]. *Reprod Domest Anim*, 2021, 56 (3): 459-466.
- YESTE M. Recent advances in boar sperm cryopreservation; state of the art and current perspectives [J]. *Reprod Domest Anim*, 2015, 50 (Suppl 2): 71-79.
- GARCÍA-VÁZQUEZ F A, MELLAGI A, ULGUIM R R, et al. Post-cervical artificial insemination in porcine: the technique that came to stay [J]. *Theriogenology*, 2019, 129: 37-45.
- HUSSAINI S, ZHANDI M, SHAHNEH Z A, et al. High dilution rate of bull semen affects cryopreservation outcomes: kinematic and flow cytometric parameters [J]. *Iran J Vet Med*, 2018, 4: 377-382.
- SALAMON S, MAXWELL W M. Storage of ram semen [J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, 62 (1/2/3): 77-111.
- ALCAY S, USTUNER B, AKTAR A, et al. Goat semen cryopreservation with rainbow trout seminal plasma supplemented lecithin-based extenders [J]. *Andrologia*, 2020, 52 (4): e13555.
- ALVAREZ M, ANEL-LOPEZ L, BOIXO J C, et al. Current challenges in sheep artificial insemination: a particular insight [J]. *Reprod Domest Anim*, 2019, 54 (Suppl 4): 32-40.
- HAYDEN S S, BLANCHARD T L, BRINSKO S P, et al. Pregnancy rates in mares inseminated with 0.5 or 1 million sperm using hysteroscopic or transrectally guided deep-horn insemination techniques [J]. *Theriogenology*, 2012, 78 (4): 914-920.
- 李助南, 郭良辉, 袁微, 等. 不同稀释液对山羊精液的保存效果 [J]. *湖北农学院学报*, 2001 (3): 217-219.
- 郝冠英. 甘油、DMA 及大豆卵磷脂对绵羊精液冷冻及低温保存效果的影响 [D]. 石河子: 石河子大学, 2022.
- ESLAMI M, JAHAN-ROSHAN N, FARROKHI-ARDABILI F. Influence of dibenone on ram semen quality stored at 4 ℃ [J]. *Reprod Domest Anim*, 2019, 54 (3): 486-497.
- BHALOTHIA S K, MEHTA J S, KUMAR T, et al. Melatonin and canthaxanthin enhances sperm viability and protect ram spermatozoa from oxidative stress during liquid storage at 4 ℃ [J]. *Andrologia*, 2022, 54 (1): e14304.
- ZHANG L M, SOHAIL T, LI Y J, et al. Effect of different extenders on the sperm quality parameters of Hu ram semen preserved at 16 ℃ [J]. *Kafkas Univ Vet Fak*, 2021, 27 (1): 83-91.
- 褚长江. 辅酶 Q₁₀ 对湖羊精液常温保存效果的研究 [D]. 扬州: 扬州大学, 2021.
- WANG Y, ZHANG L, SOHAIL T, et al. Chlorogenic acid improves quality of chilled ram sperm by mitigating oxidative stress [J]. *Animals (Basel)*, 2022, 12 (2): 163.
- SHOAE A, ZAMIRI M J. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender [J]. *Anim Reprod Sci*, 2008, 104 (2/3/4): 414-418.
- FAIGL V, VASS N, JÁVOR A, et al. Artificial insemination of small ruminants: a review [J]. *Acta Vet Hung*, 2012, 60 (1): 115-129.
- JIMOH O A, AKINOLA M O, OYEYEMI B F, et al. Potential of watermelon (*Citrullus lanatus*) to maintain oxidative stability of

- rooster semen for artificial insemination [J]. *J Anim Sci Technol*, 2021, 63 (1): 46-57.
- [23] 段元彬, 刘小林, 江中良, 等. 稀释液和稀释比例对番鸭精子活率、质膜完整率和受精率的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2020, 56 (8): 121-124.
- [24] PACE M M, GRAHAM E F. The release of glutamic oxaloacetic transaminase from bovine spermatozoa as a test method of assessing semen quality and fertility [J]. *Biol Reprod*, 1970, 3 (2): 140-146.
- [25] GRIGGERS S, PACCAMONTI D L, THOMPSON R A, et al. The effects of pH, osmolarity and urine contamination on equine spermatozoal motility [J]. *Theriogenology*, 2001, 56 (4): 613-622.
- [26] 李会玲, 邹家浩, 雷博, 等. 不同稀释液及稀释比例对关中奶山羊精液低温保存效果的影响 [J]. *中国牛业科学*, 2022, 48 (1): 80-84.
- [27] 赵乐乐, 陆雪林, 袁红艳, 等. 不同精液稀释配比和输精间隔对母鸡受精率的影响 [J]. *畜禽业*, 2019, 30 (11): 12-13.
- [28] CATT S L, O'BRIEN J K, MAXWELL W, et al. Assessment of ram and boar spermatozoa during cell-sorting by flow cytometry [J]. *Reprod Domest Anim*, 2010, 32 (5): 251-258.
- [29] RODRIGUEZ L A, SOOM V A, ARSENAKIS I, et al. Boar management and semen handling factors affect the quality of boar extended semen [J]. *Porcine Health Manag*, 2017, 3: 1-12.
- [30] DURAIRAJANAYAGAM D, SINGH D, AGARWAL A, et al. Causes and consequences of sperm mitochondrial dysfunction [J]. *Andrologia*, 2021, 53 (1): e13666.
- [31] 王根盛. 葛根素对猪精液常温保存效果的研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2023.
- [32] ARANDO A, DELGADO J V, LEÓN J M, et al. Effect of three commercial extenders on sperm motility and fertility in liquid ram semen stored at 15 °C or 5 °C [J]. *Acta Vet Hung*, 2019, 67 (3): 430-444.
- [33] 王俊琴. 奶绵羊精液冷冻程序的探索与研究 [D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2019.
- [34] 康言, 王彦虎, 张柳明, 等. 不同稀释液对湖羊精液低温保存效果的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2022, 58 (12): 183-188.
- [35] 锁云鹏, 李晓彤, 李延森, 等. 大约克公猪精液质量与粪便菌群的相关性分析 [J]. *南京农业大学学报*, 2024, 47 (1): 123-132.
- [36] 赵同渊, 夏娜, 刘玉静, 等. 不同因素对山羊精液低温保存效果的影响 [J]. *中国畜禽种业*, 2023, 19 (4): 21-24.