

鸭精液细管法冷冻保存及解冻程序的建立

陶志云, 宋卫涛, 徐文娟, 朱春红, 刘宏祥, 王逸飞, 王志成, 章双杰, 李慧芳

(江苏省家禽科学研究所, 江苏扬州 225125)

摘要: 试验以BPSE为鸭精液稀释液, 探讨细管法冷冻、保存及解冻技术对鸭精液冷冻、解冻后活力、活率及受精率等的影响。比较不同体积分数的甘油(GL)、二甲基亚砷(DMSO)、二甲基乙酰胺(DMA)3种冷冻保护剂在4℃平衡不同时间对鸭精液活力的影响以及不同解冻条件和不同保存时间(1、30、365 d)对鸭精液活力和活率的影响, 且评价冷冻后鸭精液与新鲜鸭精液(CK)的受精率和孵化率差异。结果表明, 在6% DMA中平衡45 min和8% DMA中平衡30 min冷冻, 解冻后的鸭精子活力较好, 分别为0.416和0.415, 二者间无显著差异; 采用37℃ 30 s解冻后的鸭精液活率为57.18%, 显著高于4℃ 3 min解冻后的精液活率(45.28%); 在液氮中保存1、30、365 d, 解冻后鸭精液的活力和活率差异均不显著; 冷冻精液解冻后的受精率为37.73%, 显著低于对照组的受精率(93.24%); 冷冻鸭精液解冻后的孵化率为84.79%, 显著低于对照组的孵化率(92.19%)。研究建立的在8% DMA中平衡30 min的细管法可用于鸭精液的冷冻保存, 37℃解冻30 s可用于鸭精液的解冻。

关键词: 鸭精液; 细管法; 冷冻保护剂; 解冻温度

中图分类号: S834.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-2481(2024)06-0122-06

Establishment of Program of the Freezing, Preserving, and Thawing Technology of Duck Semen Using Thin Tube Method

TAO Zhiyun, SONG Weitao, XU Wenjuan, ZHU Chunhong, LIU Hongxiang,

WANG Yifei, WANG Zhicheng, ZHANG Shuangjie, LI Hui Fang

(Jiangsu Institute of Poultry Science, Yangzhou 225125, China)

Abstract: In this study, BPSE was used as ducks semen diluent to explore the effect of thin tube freezing, preserving, and thawing technology on duck semen vitality, survival rate, and fertilization rate after cryopreservation and thawing. The effects of different volume fraction of 3 cryoprotectants including glycerol(GL), dimethyl sulfoxide(DMSO), and dimethyl acetamide (DMA) cryoprotectants at 4℃ for different equilibrium times on duck semen vitality were compared, and the effects of different thawing conditions and storage time on semen vitality and survival rate were compared. The fertilization rate and hatching rate of frozen duck semen and fresh duck semen(CK) were evaluated. The results showed that the vitality of the duck semen after thawing was better when balanced for 45 min in 6% DMA and 30 min in 8% DMA, with values of 0.416 and 0.415, respectively, and there was no significant difference between the two group. The semen survival rate after thawing at 37℃ for 30 s was 57.18%, significantly higher than that(45.28%) after thawing at 4℃ for 3 min. There was no significant difference in semen vitality and survival rate after thawing in liquid nitrogen for 1, 30, 365 d; the fertilization rate of thawed frozen semen was 37%, which was significantly lower than that(93.24%) of the control group. The hatching rate of thawed frozen semen was 84.79%, which was significantly lower than that(92.19%) of the control group. The thin tube method established in the study balanced for 30 min in 8% DMA could be used for cryopreservation of duck semen, and thawing for 30 s at 37℃ could be used for duck semen thawing.

Key words: duck semen; thin tube method; cryoprotectant; thawing temperature

精液冷冻保存技术利用低温对精液进行长期保存, 是畜禽遗传资源收集和保护中的重要技术,

通过公畜禽精液冷冻保存用于濒危物种的资源保护, 不但解决人工授精在时间和空间上的限制, 同

收稿日期: 2024-01-18

基金项目: “十四五”重点研发专项(2022YFD1300100); 扬州市科技计划项目(YZ2022050); 江苏省现代农业(水禽)产业技术体系(JATS[2023]365); 国家家养动物物种质资源库(2024)

作者简介: 陶志云(1979-), 女, 安徽滁州人, 副研究员, 博士, 主要从事家禽免疫及遗传育种研究工作。

通信作者: 李慧芳(1974-), 女, 山西阳泉人, 研究员, 博士, 主要从事家禽遗传育种与家禽资源保护研究工作。

时有效降低保种成本,该技术在家畜精子冷冻保存中已广泛应用^[1-3]。但禽类精子结构比较特殊,与哺乳类动物相比,其精子结构更加细长,对冷冻损伤更加敏感,抗冻性能更差^[4-5],因此,禽类精液的冷冻保存技术远远落后于哺乳动物。

家禽精液冷冻最早开始于1941年,SHAFFNER等^[6]将鸡的精液用高渗果糖稀释后进行冷冻,解冻后的鸡精子活力非常有限。1949年,POLGE等^[7]发现甘油作为冷冻保护剂对鸡和牛精液冷冻具有保护作用,解冻后精液能够恢复活力,使得精液冷冻保存取得了突破性的进展,标志着精液冷冻保存技术的诞生。目前,鸡的精液冷冻保存技术在稀释液^[8-10]、抗冻剂^[9-11]、冷冻程序^[11-12]以及初冻和解冻温度^[10,12-13]等方面已有较多研究,取得了一些进展^[14]。而鸭精液冷冻相关的研究报道较少,攸县麻鸭精液二甲基乙酰胺(DMA)细管冷冻后的活力平均为0.33,活力0.3以上的冻精输精后的受精率达85.93%^[15]。有研究表明,不同个体金定鸭的精子抗冻性存在差异,在鸭小群试验中,冷冻精液解冻后的活力最高为0.73,受精率最高达65%,最低活力仅为0.25^[16]。TANG等^[17]将DMA作为冷冻保护剂,比较麦管法和颗粒法冷冻鸡和鸭精液后的活力、受精率和孵化率,结果表明,DMA麦管法优于颗粒法,鸭精液冷冻解冻后受精率达到85.93%。但目前家禽精液冷冻保存研究表明,冷冻-解冻后的活力、受精率等指标差异较大,远远未达到应用的要求,迫切需要建立适合鸭精液冷冻保存和解冻程序,以推进鸭优异种质资源的保护和利用,促进养鸭产业的健康发展和种业振兴。

本研究通过比较3种冷冻保护剂、浓度、平衡时间以及解冻温度对鸭精液解冻后活力、活率及受精率等的影响,建立适合鸭精液冷冻保存和解冻程序,结合本课题组在鸭人工授精技术上的优势,比较冷冻鸭精液与新鲜鸭精液经人工授精后的受精率和孵化率的差异,为鸭种质资源的保存提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验在高邮鸭集团试验基地完成,选择43周龄的健康金定公鸭30只、母鸭200只,所有鸭阶梯单笼饲养,按照蛋鸭饲养标准饲养,自由饮水。

1.2 主要试剂

甘油(GL,国药集团化学试剂有限公司,纯度

99.0%),二甲基亚砜(DMSO,北京索莱宝科技有限公司,纯度99.9%),二甲基乙酰胺(DMA,上海麦克林生化科技有限公司,纯度99.0%),吉姆萨染色液(北京索莱宝科技有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 精液稀释液的配制 使用BPSE(Beltsville Poultry Semen Extender,布里斯维尔家禽精液)稀释液作为鸭精子稀释液,配制方法:依次称量D-果糖0.5 g、谷氨酸钠0.867 g、六水氯化镁0.034 g、醋酸钠0.43 g、柠檬酸钠0.064 g、磷酸二氢钾0.065 g、磷酸氢二钠0.473 2 g、N-三甲基-2-氨基乙磺酸(TES)0.195 g,放入100 mL容量瓶中,加入ddH₂O溶解,定容至100 mL,调节pH值为7.2~7.4,用细菌过滤器过滤后置于4℃冰箱中待用,放置时间不超过14 d。

1.3.2 精液采集 精液采集一般在9:00开始,试验开始前需采用按摩+诱导的方法对公鸭进行人工采精训练,经训练后采集的合格鸭精液呈浓稠状乳白色液体,无粪便和尿液等杂质污染,经镜检活力达0.8以上。采集鸭新鲜精液于15 mL离心管中,轻轻混合均匀,按1:1比例加入4℃预冷的精液稀释液4℃平衡1 h。

1.3.3 冷冻保护剂平衡试验 将GL、DMSO和DMA分别与精液稀释液混合,配制8%、12%、16%和20%的GL、DMSO和DMA冷冻保护剂,与1.3.2中鸭精液稀释液1:1比例混合均匀,GL、DMSO和DMA最终使用浓度为4%、6%、8%和10%,于4℃平衡15、30、45、60 min。

1.3.4 精液冷冻与解冻 将平衡后的鸭精液吸至0.25 mL麦管(冷冻用细管)中,置于装有液氮的泡沫盒液面上方3 cm处的铜网上,熏蒸7 min,放至液氮中。解冻时,将其从液氮中取出,立即放入4℃3 min,或37℃水浴30 s,用精子全自动分析仪(南京松景天伦生物技术有限公司,ML-500JZ)检测精子活力,吉姆萨染色法检测精子活率,并计算精子复苏率。

精子复苏率=精子冷冻后活率/精子冷冻前活率×100% (1)

1.3.5 受精率和孵化率检测 将鸭精液解冻后立即进行人工输精,每只母鸭输精0.2 mL,为冷冻组;新鲜精液稀释10倍后输精,每只母鸭输精0.1 mL,为对照组,各100只母鸭,连续输精2 d后收集3 d种蛋,蛋上做好标记后入孵化器孵育。在种蛋入孵

后 6 d, 将种蛋取出照蛋, 检测是否受精, 统计受精率。在种蛋入孵后 28 d, 统计出雏只数, 计算孵化率。

$$\text{受精率} = \frac{\text{受精种蛋数}}{\text{入孵种蛋数}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{孵化率} = \frac{\text{出雏数}}{\text{受精种蛋数}} \times 100\% \quad (3)$$

1.4 数据处理与分析

试验中所有数据用 SPSS 20.0 软件进行处理, 单因素方差分析各数据的均值并比较均值之间的

差异。

2 结果与分析

2.1 冷冻保护剂种类、浓度及平衡时间对鸭精液的冷冻效果

冷冻保护剂种类、浓度及平衡时间对鸭精液冷冻后活力的影响结果如表 1 所示。

表 1 冷冻保护剂种类、浓度及平衡时间对鸭精液冷冻后活力的影响

Tab.1 The effect of cryoprotectant types, concentrations, and equilibrium time on the viability of frozen duck semen

组别 Group	最终体积分数/% Final volume fraction	平衡时间/min Equilibration time			
		15	30	45	60
二甲基亚砜 DMSO	4	0.207±0.022a	0.228±0.015a	0.292±0.029bcdef	0.270±0.017bc
	6	0.245±0.045ab	0.282±0.023bcdef	0.261±0.062cdef	0.293±0.018bcdef
	8	0.290±0.012bcdef	0.322±0.019cdefgh	0.331±0.163cde	0.303±0.017cdef
	10	0.297±0.019bcdef	0.324±0.015cdefgh	0.313±0.019de	0.278±0.014bcd
甘油 GL	4	0.201±0.022a	0.212±0.009a	0.212±0.011a	0.218±0.015a
	6	0.226±0.045a	0.274±0.021bcd	0.301±0.011bcdef	0.306±0.007cdef
	8	0.305±0.011cdef	0.318±0.023bcdef	0.316±0.012a	0.332±0.008defgh
	10	0.299±0.019bcdef	0.315±0.012cdefg	0.305±0.008cdef	0.317±0.008cdefg
二甲基乙酰胺 DMA	4	0.284±0.014bcde	0.391±0.018jk	0.367±0.016ghij	0.292±0.017bcdef
	6	0.301±0.073bcdef	0.366±0.008ghij	0.416±0.010k	0.321±0.005cdefgh
	8	0.368±0.008ghij	0.415±0.012k	0.373±0.013hijk	0.339±0.016efghi
	10	0.299±0.014bcdef	0.304±0.013cdef	0.389±0.011ijk	0.318±0.015cdefg

注: 同列间不同小写字母表示组别间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

Note: The different lowercase letters in the column indicated significant differences between groups ($P < 0.05$). The same as below.

从表 1 可以看出, 在 DMSO 作冷冻保护剂组, 以 8% DMSO 中平衡 45 min 冷冻后的鸭精子活力最高, 为 0.331; 在 GL 为冷冻保护剂组, 以 8% GL 中平衡 60 min 的鸭精子冻后活力最高, 为 0.332; 在 DMA 为冷冻保护剂组, 以 6% DMA 中平衡 45 min 和 8% DMA 中平衡 30 min 的冷冻效果较好, 活力分别为 0.416 和 0.415, 但二者间无显著差异。

2.2 不同解冻温度对鸭精液的冷冻效果

采用 2.1 中确定的 8% DMA 和预平衡时间 30 min 进行鸭精液冷冻, 比较 4 °C 和 37 °C 下 2 种解冻温度对精液冷冻复苏后活力和活率的影响。结果如表 2 所示, 2 种解冻温度下的鸭精子活力无显著差异, 但鸭精子活率和复苏率在 37 °C 组显著高于 4 °C 组 ($P < 0.05$)。

表 2 解冻温度对鸭精液活力和活率的影响

Tab.2 The effect of thawing temperature on duck semen vitality and survival rate

组别 Group	冷冻前活力 Vitality before freezing	冷冻前活率/% Survival rate before freezing	冷冻后活力 Vitality after freezing	冷冻后活率/% Survival rate after freezing	精子复苏率/% Sperm resuscitation rate
4 °C 3 min	0.950±0.014a	97.74±1.07a	0.387±0.013a	45.28±1.07a	46.33±0.66a
37 °C 30 s	0.950±0.014a	97.74±1.07a	0.419±0.016a	57.18±1.17b	58.51±1.35b

2.3 液氮中保存时间对精液的冷冻效果

比较在液氮中保存不同时间对鸭精液冷冻效

果的影响, 结果如表 3 所示, 冷冻 1、30 d 和 365 d, 解冻后鸭精液的活力、活率和精子复苏率差异均

不显著。

2.4 冷冻对受精率和孵化率的影响

采用8% DMA和预平衡时间30 min进行鸭精液冷冻,保存7 d后,37℃解冻鸭精液。将新鲜采集的鸭精液(对照组)和解冻后的鸭精液(冷冻组)采用人工授精的方法输入母鸭体内,收集种蛋,比较

受精率和孵化率的差异,结果如表4所示,冷冻组的受精率(37.73%)显著低于对照组的受精率(93.24%)($P<0.01$),冷冻组的孵化率(84.79%)显著低于对照组的孵化率(92.19%)($P<0.05$)。结果表明,冷冻精液明显降低了鸭的受精率和孵化率。

表3 冷冻时间对鸭精液活力和活率的影响
Tab.3 The effect of freezing time on the duck semen vitality and survival rate

组别 Group	冷冻前活力 Vitality before freezing	冷冻前活率/% Survival rate before freezing	冷冻后活力 Vitality after freezing	冷冻后活率/% Survival rate after freezing	精子复苏率/% Sperm resuscitation rate
1 d	0.933±0.017a	95.81±1.72a	0.412±0.024a	52.29±1.24a	56.31±2.27a
30 d	0.933±0.017a	95.81±1.72a	0.402±0.009a	53.49±2.48a	55.83±2.50a
365 d	0.933±0.017a	95.81±1.72a	0.415±0.017a	53.97±3.01a	54.59±1.53a

表4 冷冻精液对鸭受精率和孵化率的影响
Tab.4 The effect of freezing semen on fertilization rate and hatching rate of duck

组别 Group	收集种蛋数/个 Breeding egg number	受精数/个 Fertilization number	受精率/% Fertilization rate	出雏数/只 Number of hatchlings	孵化率/% Hatching rate
对照组 Control	397	370	93.24±1.70A	344	92.19±2.51a
冷冻组 Freezing	410	155	37.73±2.26B	131	84.79±3.60b

注:同列比较,不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)。

Note: Comparing in the same column, different lowercase letters indicated significant differences($P<0.05$), different capital letters indicated extremely significant differences($P<0.01$).

3 结论与讨论

2006年,公鸭和公鸡精子在低温冷冻保存中的耐受力差异研究表明,鸭精液采用颗粒和细管2种载体进行冷冻,细管冷冻后的鸭精子活率和顶体完整率均高于颗粒冷冻后的精子^[17]。近年,TANG等^[16]比较麦管法和颗粒法冷冻鸡精液的结果表明,麦管组的受精率和孵化率分别为77.61%和92.30%,显著高于颗粒组。而且细管型鸭精液冷冻的方法操作简单,污染少,更适合精子的长期冷冻保存,其在家畜中也是广泛使用的一种方法^[18-20],因此,本研究选用细管冷冻法进行鸭的精液冷冻。

二甲基亚砜(DMSO)、甘油(GL)和二甲基乙酰胺(DMA)是精液冷冻中常用的渗透性冷冻保护剂^[21]。6% DMA和10% DMSO这2种抗冻剂对鸡精子冷冻后活力和活率的影响研究表明,含6% DMA抗冻剂组的精子活力和活率分别为27.05%和47.65%,分别显著高于10% DMSO抗冻剂组精子活力(47.65%)和活率(35.13%)^[12]。GL、DMSO、DMA、二甲基甲酰胺(DMF)、乙二醇(EG)5种冷

冻剂对鸡精子冷冻后活率的影响研究发现,冷冻后鸡精子活力最高的为8%的GL组(0.43),其次为6% DMA组(0.36)、8% DMF(0.33)、6% DMSO(0.32)和6% EG(0.22)^[13]。TANG等^[16]比较了甲基甲酰胺、甲基乙酰胺、二甲基乙酰胺(DMA)、二甲基甲酰胺(DMF)和丙二醇(PG)几种冷冻保护剂对鸡精液的冷冻效果,结果表明,DMA和DMF组解冻后精子的活力和质膜完整性最高。GL、DMSO、DMA及DMF等4种冷冻保护剂对金定鸭精液冷冻后活率的影响研究发现,10% DMSO组精子冷冻后活力最高,达0.7,依次为10% GL(0.68)、10% DMA(0.67)和10% DMF(0.64),但未见受精率和孵化率的报道^[15]。本研究比较了不同浓度DMSO、GL和DMA等3种抗冻剂中平衡不同时间对金定鸭精子活力和活率的影响,结果表明,在6% DMA中平衡45 min冷冻后精子活力(0.416)和8% DMA中平衡30 min冷冻后精子活力(0.415)较高,显著高于DMSO和GL组。以上结果表明,不同试验中冷冻保护剂的冷冻保护效果差异较大,这可能与精液稀释液种类、冷冻程序等多种因素有关。

解冻温度也是影响精子冷冻后活率的重要因素。高小莉等^[13]分别用颗粒法和细管法冷冻鸡精液后,比较 40、55、70 °C 解冻温度对鸡精子活力的影响,结果表明,颗粒法冷冻组,55 °C 解冻后鸡的精子活力最高(0.482),而细管法冷冻组 40 °C 解冻的精子活力最高(0.152)。以颗粒法冷冻鸡精液,8% GL+6% DMA+6% EG 为抗冻剂,筛选出最佳初冻和解冻温度为-140 °C 和 50 °C,并提出在鸡的精子冷冻中,快速冷冻对应快速解冻,慢速冷冻对应慢速解冻,且快速冷冻解冻的冷冻保存效果较好^[12]。陈继兰等^[22]在鸡的精液冷冻研究中,采用程序化冷冻,6%~7% 甘油做冷冻保护剂,4 °C 解冻获得了 60% 以上的受精率。本试验比较了 37 °C 和 4 °C 解冻温度对鸭精子解冻后精子活力和活率的影响,结果表明,37 °C 解冻后的精子活力和活率均显著高于 4 °C 解冻后的精子活力和活率,说明采用 DMA 细管法、在液氮上方 3 cm 熏蒸 7 min 的冷冻方法冷冻金定鸭精子,更适合 37 °C 解冻。

长期冷冻保存是精液冷冻保存的目标,因此,本试验评价了在液氮中保存不同时间对精液活力和活率的影响,结果表明,在液氮中保存 365 d 和保存 30 d 或 1 d 之间没有显著差异,说明在液氮中保存时间对冷冻效果影响不大,可用于长期保存。

受精率和孵化率是评价精液冷冻效果的最直接指标,早在 2019 年研究报道采用 DMA 细管法冷冻攸县麻鸭精液,受精率达到 85.9%^[4]。2004 年研究报道,鸭的精液经冷冻后输精,受精率最高的可达到 64.75%,最低的为 0%^[14]。本研究采用 DMA 细管法冷冻金定鸭精液,最终获得了 37.73% 的受精率,低于在攸县麻鸭中的受精率,这可能与鸭的品种、年龄、冷冻程序等多种因素有关,同时也提示鸭的精液冷冻技术仍不成熟,尚需进一步优化。

本研究比较并筛选出适合鸭精液冷冻保存的冷冻保护剂 DMA,以 8% DMA 中平衡 30 min 冷冻,37 °C 解冻效果较好,冷冻后精液的活率可达到 50% 以上,人工输精后的受精率可达到 37.73%。本研究建立的鸭精液冷冻-解冻程序可用于鸭精液的长期冷冻保存,但该冷冻-解冻程序用于鸭精液冷冻、解冻并受精后的受精率仍偏低。推测冷冻后的鸭精子受精率低可

能与冷冻和解冻过程造成的鸭精子物理和化学损伤有关,后续将对鸭的精液冷冻-解冻程序进一步优化,并同时将对鸭冷冻-解冻程序对鸭精子的物理和化学损伤的分子机制进行研究,解析鸭精液冷冻损伤机理,进一步应用于鸭的精液冷冻保存中,以提高鸭精液的冷冻保存效果。

参考文献:

- [1] YÁNEZ-ORTIZ I, CATALÁN J, RODRÍGUEZ-GIL J E, et al. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep[J]. *Animal Reproduction Science*, 2022, 246:106904.
- [2] OLDENHOF H, WOLKERS W F, SIEME H. Cryopreservation of semen from domestic livestock: bovine, equine, and porcine sperm[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2180: 365-377.
- [3] WOELDERS H. Cryopreservation of avian semen[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2180: 379-399.
- [4] 聂瑞雪, 李俊英, 苗欢欢, 等. 鸡精液冷冻保存技术研究进展[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(7): 81-86.
NIE R X, LI J Y, MIAO H H, et al. Research progress on rooster semen cryopreservation[J]. *Chinese Journal of Animal Science*, 2021, 57(7): 81-86.
- [5] SANTIAGO-MORENO J, ESTESO M C, VILLAVARDE-MORCILLO S, et al. Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction technologies[J]. *Asian Journal of Andrology*, 2016, 18(6): 882-888.
- [6] SHAFFNER C S, HENDERSON E W, CARD C G. Viability of spermatozoa of the chicken under various environmental conditions[J]. *Poultry Science*, 1941, 20(3): 259-265.
- [7] POLGE C, SMITH A U, PARKES A S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures[J]. *Nature*, 1949, 164: 666.
- [8] 何孟纤, 汪俊跃, 孙玲伟, 等. 6 种鸡精液冷冻稀释液以及冻后保存条件比较[J]. *中国农业科技导报*, 2022, 24(10): 53-61.
HE M Q, WANG J Y, SUN L W, et al. Comparison of six diluents and preservation conditions on rooster semen[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2022, 24(10): 53-61.
- [9] WOELDERS H, DE WIT A A C, ENGEL B, et al. Freezing chicken semen: Influence of base medium osmolality, cryoprotectants, cryoprotectant concentration, and cooling rate on post-thaw sperm survival[J]. *Cryobiology*, 2022, 108: 67-77.
- [10] MURUGESAN S, MAHAPATRA R. Cryopreservation of Ghagus chicken semen: Effect of cryoprotectants, diluents and thawing temperature[J]. *Reproduction in Domestic Animals= Zuchthygiene*, 2020, 55(8): 951-957.
- [11] 李博宇, 郭勇, 倪和民, 等. 不同抗冻保护剂对鸡精液冷冻效果及基因表达的影响[J]. *中国农业大学学报*, 2021, 26(8): 131-139.
LI B Y, GUO Y, NI H M, et al. Effects of different cryoprotect-

- tants on the freezing effect and gene expression of chicken sperm[J]. Journal of China Agricultural University, 2021, 26(8):131-139.
- [12] 楚金雨,范折霞,石思雅,等.不同精液冷冻程序对杏花鸡精液冷冻效果的影响[J].养禽与禽病防治,2021(5):33-39.
CHU J Y, FAN Z X, SHI S Y, et al. [J]. Poultry Husbandry and Disease Control, 2021(5):33-39.
- [13] 高小莉,张兆旺,杜秋晨,等.不同抗冻剂及初冻和解冻温度对鸡精液冷冻保存的影响[J].甘肃农业大学学报,2018,53(4):15-21,28.
GAO X L, ZHANG Z W, DU Q C, et al. The effect of the different cryoprotectant, start freezing and thawing temperature on the cryopreservation of chicken semen[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2018, 53(4):15-21, 28.
- [14] 袁景阳,喻宗岗,张明军,等.攸县麻鸭DMA细管精液冷冻技术研究[J].生命科学研究,23(2):115-121.
YUAN J Y, YU Z G, ZHANG M J, et al. Study on frozen semen of Youxian partridge duck by straw and DMA[J]. Life Science Research, 2019(2):115-121.
- [15] 韩雪峰,刘福柱,杨长锁.鸭精液冷冻保存试验研究[J].中国畜牧兽医,2004,31(7):45-46.
HAN X F, LIU F Z, YANG C S. Study on cryopreservation of duck semen[J]. Animal Science Abroad, 2004, 31(7):45-46.
- [16] TANG M X, CAO J L, YU Z G, et al. New semen freezing method for chicken and drake using dimethylacetamide as the cryoprotectant[J]. Poultry Science, 2021, 100(8):101091.
- [17] 刘建忠,周丽芳,朱艳君,等.公鸭、公鸡精子对在液氮中低温冷冻保存耐受力的比较研究[J].武汉科技大学学报(自然科学版),2006,29(2):186-188.
LIU J Z, ZHOU L F, ZHU Y J, et al. A comparative study on durability in liquid nitrogen cryopreservation between drake and cock spermatozoa[J]. Journal of Wuhan University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2006, 29(2):186-188.
- [18] 桑国俊,郭海龙,王珂,等.两种新剂型牛细管冻精精子质量评定[J].中国牛业科学,2015,41(6):60-62.
SANG G J, GUO H L, WANG K, et al. Quality test for two types bovine frozen semen of wheat straw[J]. China Cattle Science, 2015, 41(6):60-62.
- [19] 唐淑红,吴建,李凤珍.细毛羊细管冷冻精液制作技术研究[J].中国畜牧业,2021(21):49-50.
TANG S H, WU J, LI F Z. Study on technology of making frozen semen of fine wool sheep[J]. China Animal Industry, 2021(21):49-50.
- [20] 许光明,曹传闰,王勃,等.利用0.5ml细管冷冻梅山猪精液效果研究[J].上海畜牧兽医通讯,2022(5):23-26.
XU G M, CAO C G, WANG B, et al. Study on the Effect of freezing Meishan pig semen with 0.5mL finetube[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2022, (5):23-26.
- [21] 张美娜,郭富强,宋国欣,等.冷冻保护剂对家畜精液冷冻保存的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2019(21):37-41,45.
ZHANG M N, GUO F Q, SONG G X, et al. Research progress in cryoprotectant of livestock Semen cryopreservation[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2019(21):37-41, 45.
- [22] 陈继兰,李云雷,宋云鹤,等.一种鸡精液冷冻保存及人工输精用试剂盒及其使用方法:20110959592.X[P]. 2021-08-20.
CHEN J L, LI Y L, SONG Y H, et al. A reagent kit for cryopreservation and artificial insemination of chicken semen and its usage method:20110959592.X[P]. 2021-08-20.