

# 牛精液冷冻技术的研究进展

## The Research Advance of the Technology of Bull Semen Cryopreservation

胡传活<sup>1</sup> 胡传水<sup>2</sup> 梁兴伟<sup>1</sup> 卢克焕<sup>1\*</sup>  
Hu Chuanhuo<sup>1</sup> Hu Chuanshui<sup>2</sup> Liang Xingwei<sup>1</sup> Lu Kehuan<sup>1</sup>

(1. 广西大学动物繁殖研究所 南宁市大学路 100 号 530005;  
2. 广西农业职业技术学院 南宁市大学西路 48 号 530007)  
(1. Animal Reproduction Institute, Guangxi Univ., 100 Daxuelu, Nanning,  
Guangxi, 530005, China; 2. Guangxi College of Agric Vocational  
Techniques, 48 West Daxuelu, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要** 简要介绍精液冷冻技术发展历史, 分析影响牛冷冻精液受胎率的主要技术因素。认为近年来冻精生产和应用的各个环节均没有重大突破, 今后应该继续对这些环节进行优化组合, 尤其是在水牛冻精生产技术的标准化、细管冻精生产成本的降低及分离精子的冷冻保存等方面应加大研究投入和力度。

**关键词** 牛 水牛 精液 冷冻保存 人工授精

中图分类号 S814.3

**Abstract** After having briefly introduced the history of the technology of semen cryopreservation, we analyzed the key technological factors influencing the fertility of bull frozen-thawed semen. The result showed as followed: no important breakthrough was made in every link of cryopreserved semen production and application in the past few years. In the days to come these links should be optimized and combined continuously, and the research input and strength should be stepped up especially in the technological standardization of buffalo semen cryopreservation, the reduction of production cost per straw and the cryopreservation of sorted spermatozoa.

**Key words** bull, buffalo, semen, cryopreservation, artificial insemination

精液冷冻保存是利用液氮等作为冷源, 将精液长期保存的一种繁殖技术。它是人工授精技术的一项重大革新, 可使精液利用不受时间、地域和种畜生命的限制<sup>[1]</sup>。

### 1 精液冷冻技术的发展简史

精液冷冻保存始于 1803 年 Spallanzani 用雪冷却精子的试验<sup>[2]</sup>。一个多世纪之后, Luyet<sup>[3]</sup> 通过蛙精子冷冻试验提出冰冻过程的玻璃化学说。1949 年精液冷冻技术出现重大突破, Polge 等<sup>[4]</sup> 用含甘油的稀释液在酒精干冰冷冻鸡精液, 发现可使精子保持原活率。1951 年 Stewart<sup>[5]</sup> 报道用冷冻精液授精生了一

头牛犊。之后, 冷冻精液技术开始应用于生产。但是, 该项技术在实践中大量应用只是在 20 世纪 60 年代中期以后, 而且仅限于牛。其他畜禽及野生动物冷冻精液的研究进展也很快, 但受胎率偏低, 目前仍处于实验或中试阶段<sup>[1]</sup>。我国 1958 年首次成功进行了精液冷冻技术研究<sup>[3]</sup>, 之后在全国广泛研究及推广, 以奶牛应用最多<sup>[2]</sup>, 20 世纪 80 年代引进生产技术和设备, 20 世纪 90 年代逐步由颗粒型转向细管型<sup>[6]</sup>。

### 2 影响牛冷冻精液受胎率的主要技术因素

#### 2.1 精液的品质检查

尚未开发出一种单项检测来准确预示精液的受精力, 但研究认为如果将若干评定结果综合起来, 就可选出有较高受精潜能的精液。目前已经建立了

2004-03-25 收稿。

\*通信作者, E-mail: khlu@gxu.edu.cn Tel: (0771)3238064

一个标准的精液分析方案<sup>[2,7]</sup>。另外,王锐等<sup>[8]</sup>报道,用异种穿卵试验测定精子的穿卵能力,是提高冻精受精率的有效方法。

## 2.2 精液的稀释

2.2.1 稀释液 稀释液配方的研究,近几年来未有重大突破<sup>[9]</sup>。

(1) 无动物成分稀释液: 近几年很多学者致力于此类稀释液的研究与开发,以减少污染<sup>[10,11]</sup>,但效果不尽相同。Leeuw 等<sup>[10]</sup>和 Thun<sup>[12]</sup>等分别用含大豆提取物的稀释液处理牛精液,效果都不理想,不返情率显著低于对照组。Moussa 等<sup>[13]</sup>报道,以提取的低密度脂蛋白取代卵黄,效果比商业用的稀释液好。2003年, Nabiev<sup>[14]</sup>等和 Aires<sup>[15]</sup>等报道,用含大豆卵磷脂的 AndioMedR 可获得与三基-卵黄-柠檬酸相当或优于 Tris-EY 的精液质量,但 AndioMedR 更适于生产上使用。(2) 精子保护剂: 在缓冲物方面,现转向利用三羟甲基氨基甲烷(Tris)等有机物,取得了好的效果<sup>[16,17]</sup>。董雅娟等<sup>[18]</sup>认为,含 Tris 的卵黄-糖-甘油液比不含 Tris 的同类稀释液效果好。许典新等<sup>[19]</sup>提出,以 Tris 取代柠檬酸钠,试验组细管冻精的受胎率等明显好于对照组。在非电解质或弱电解质方面,常用的是葡萄糖、果糖、乳糖及蔗糖等糖类,使用棉子糖可获得相等或更好的效果,但棉子糖价格较高,尚缺乏使用价值<sup>[1,16]</sup>。Woelders<sup>[20]</sup>等报道,海藻糖和蔗糖都可使精子免受冷冻的伤害,但蔗糖的效果明显好于海藻糖。目前常用的抗冻保护剂为甘油和二甲基亚砷(DMSO),但多数报道认为甘油的效果更好,所以甘油的应用更为广泛<sup>[1,21]</sup>。由于甘油本身对精子有一定的毒性,近年来开始开发可以取代甘油的其它抗冻物质。张振中等<sup>[22]</sup>报道,含3%甘油的“天然冻精宝”(含植物抗冻剂)与含5%甘油的乳糖液相比,精子受胎率等有显著提高。王锋等<sup>[23]</sup>报道,向稀释液I中添加乙二醇或丙二醇,精子解冻后活力与存活时间未见显著提高或延长,但精子的顶体完整率显著高于对照组。此外,白蛋白、血清也是较好的保护剂<sup>[24]</sup>。在抗生素方面,传统上使用青霉素、链霉素及氨苄磺胺控制精液中的细菌。后来又加入多黏菌素B,以扩大控制范围<sup>[2]</sup>。鉴于氨苄磺胺在冷冻时对精子有害,目前仅用于保存液态精液<sup>[3]</sup>。从1970年开始,国外试用数种新的抗生素,多数取得了较好的效果<sup>[1,2]</sup>。试验表明,新生霉素、土霉素、红霉素、泰洛霉素和多粘霉素对精子有负面作用<sup>[16]</sup>。Kommisrud 等<sup>[25]</sup>报道,加青霉素、链霉素的脱脂乳-卵黄液与加泰乐菌素、庆大霉素、壮观霉素和林肯

霉素的 BiladgalR 液相比,60 d 不返情率前者显著好于后者。普通抗生素及其混合物对牛冻精中的支原体无明显效果<sup>[26]</sup>。在抗氧化剂方面,试验效果不一。张文举<sup>[27]</sup>报道,谷胱甘肽可以显著提高母牛受胎率。Fabbrocini 等及 Bilodeau 等报道,丙酮酸盐可以明显提高地中海水牛精子冻后质量<sup>[28]</sup>和牛常用稀释液的抗氧化性能<sup>[29]</sup>。Bilodeau 等<sup>[30]</sup>的试验表明,在冻后被稀释的精液中添加各种硫醇,可以消除在 EYTG 冷冻后过氧化氢对精子的有害作用。Kobayashi 等<sup>[31]</sup>报道,奶或其它外分泌腺分泌物中的乳铁蛋白可以明显提高精子的活率,也可促进精子的获能。但 Foote 等<sup>[32]</sup>报道,250种组合和浓度的抗氧化剂,绝大多数组合和浓度对冻后精子活力均无有利影响。(3) 其它添加成分: 近几年来这一方面的报道甚少。Verberckmoes 等<sup>[33]</sup>报道,用含附睾液的稀释液可获得更高的精子活力。

2.2.2 稀释倍数及稀释方法 稀释倍数多在118倍,每授精剂量活精子数为1000万1500万或更低<sup>[34,38]</sup>,而稀释方法趋于使用简化的一次稀释法<sup>[39,41]</sup>。

## 2.3 精液的分装

细管型冻精目前已成为冻精的主流剂型,但成本较高<sup>[42]</sup>。

## 2.4 精液的降温和平衡

目前多数报道的平衡时间(含降温时间)为: 05℃, 15h<sup>[43,44]</sup>。但谢成侠<sup>[16]</sup>认为,平衡时间可缩短至1h或更短,这很可能是将来的发展方向。

## 2.5 精液的冻结

传统的冻结方法是液氮蒸汽熏蒸法。对于安瓿、细管精液,我国采用较多的设备是大口径液氮罐,冷冻槽因其效果差,耗液氮量大几乎全部被淘汰,喷氮式冷冻仪因其价格昂贵和消耗液氮量大只有少数单位采用。邢小军等<sup>[2]</sup>报告一种细管冻精新方法即密集浸入法,该法可极大地提高每批次的冷冻数量和冻精质量,减少液氮消耗量,简化和优化冻精生产工艺。

无论何种剂型,冷冻时都应遵循科学的冷冻温度曲线,即冷冻时除考虑精液和冷源间的距离外,还应考虑冷冻容器、环境的温度及冻精的总容量<sup>[45,50]</sup>。

## 2.6 冷冻精液的贮存

试验证明精液长期保存是可能的,在20世纪70年代,牛冻精保存时间最长的已超过25a<sup>[3]</sup>。胡振尉等<sup>[51]</sup>报道,冻精经5a和10a保存之后,活力变化不大。他们用保存21a的冻精输精,产下1头正常

的母牛犊。Bielanski<sup>[52]</sup>等提出,噬麦寡养食单孢菌是细管冻精和液氮最普遍的污染物,可以显著抑制体外受精,但在精液和液氮之间没有明显的噬麦寡养食单孢菌菌株的交叉感染,受感染精液中的牛恶性痢疾病毒和牛疱疹病毒-1也不会传播到清洁的精液和液氮中。

## 2.7 冷冻精液的解冻

2.7.1 解冻方法 细管精液一般采用水浴解冻法<sup>[3]</sup>。20世纪70年代后期曾报道体内解冻法<sup>[14]</sup>。张洪国等<sup>[53]</sup>和王守岩等<sup>[54]</sup>报道,用体内解冻的牛精液授精母牛,受胎率高于对照组,故体内解冻法可以代替常规解冻法。

2.7.2 解冻温度 目前在生产上通常采用温水解冻,取得较好效果<sup>[3,55]</sup>。室温及冰水解冻后精子存活率低(尤其是剂量达1ml以上时),现已很少使用<sup>[1,16]</sup>。20世纪60年代末开始已有人推荐高温解冻,解冻温度为75-95℃之间,甚至100℃以上,据说效果比常规方法好<sup>[16]</sup>。近年来也有一些关于高温解冻的报道,其效果是肯定的<sup>[49,56]</sup>,只是操作较难控制。

2.7.3 解冻液 颗粒精液的解冻必须用解冻液。常用的解冻液为2.9%柠檬酸钠液、葡-柠液、复方蔗-柠液。近年来出现了一些更方便有效的解冻液。闫灵奇等<sup>[57]</sup>及高宏宝等<sup>[58]</sup>报道,含有一定量果糖的解冻液与柠檬酸钠液相比,受胎率明显提高。VB<sub>12</sub>可延长精子解冻后的保存时间,提高受胎率<sup>[59,60]</sup>。

## 2.8 输精

除了发情鉴定、适时输精、输精操作规程等方面外,以下3个方面亦属于冷配技术出现之后的研究热点。

2.8.1 冻精解冻后的保存 西川等<sup>[3]</sup>发现丙基二硫胺素保存精子24h后活力几乎没有降低。管艺等<sup>[61]</sup>提出,牛细管冻精温水解冻后,在5℃的环境中,其有效活力存放时间为1640h。Whitfield等<sup>[62]</sup>和Pereira等<sup>[63]</sup>的试验表明,钙离子A23187处理解冻后精液,可以提高发生顶体反应精子的比例。Correa<sup>[64]</sup>等报道,咖啡因可以进一步提高经各种精子选择技术处理后复苏精子的数量和质量标准。文国艺<sup>[65]</sup>用咖啡因处理解冻牛精液,精子经离心后加入到不含咖啡因的受精液中进行体外受精,均获得较高卵裂率及囊胚率,并且第7天一级囊胚数较多。Pereira等<sup>[63]</sup>还认为,玻璃棉过滤解冻后精液可以极大提高能动精子的百分数。张永春等<sup>[66]</sup>用含蔗糖及猪皮豚的保护剂保存解冻后牛颗粒冻精60h活力基本不变。精液解冻后,如不立即输精,应避免低温

保存<sup>[67]</sup>。

2.8.2 输精部位 一般认为,输精部位越深,受胎效果越好<sup>[3,68,69]</sup>。但容易造成子宫创伤<sup>[70]</sup>,且必须输入排卵侧子宫内。合理的输精部位是子宫体基部或卵泡侧子宫角基部<sup>[40,71]</sup>。

2.8.3 输精剂量 大多数国家输入有效精子数为1500万-3000万。目前我国的授精量为1500万(子宫深部授精),最低不少于1000万。输入精子数和部位有关,浅部授精最少需1亿精子;深部授精时,500万-1000万即可<sup>[3,72]</sup>。因此,目前国际上提出的有效精子数在500万-800万的观点,是必然的趋势。

## 3 牛精液冷冻技术的研究与应用前景

牛精液冷冻技术已普遍应用于生产,并取得良好效果。预计这项技术仍然是今后牛品种改良中应用的主要繁殖技术。我们应该继续对冻精生产工艺的各个环节进行优化组合<sup>[73]</sup>,提高冻后活力和受胎率;延长冻精冷冻保存和解冻后保存的时间,使之便于被各个地域的生产单位应用,增加种公牛的配种头数。此外,以下几方面将可能成为研究与应用的热点:(1)提高水牛冻配受胎率的技术措施。水牛杂交改良面小,冻配数量少,受胎率长期偏低。其主要原因,一是水牛冻精生产工艺没有完全标准化,冻精质量得不到保证;二是母水牛发情特征不明显,最适输精时间不好把握。(2)降低细管冻精生产各环节成本的技术措施<sup>[42,74]</sup>。(3)分离精子的冷冻保存。性别预选将加速遗传改良,提高生产效率,只有实现了有效地冷冻分离精子,牛分离精子的应用才能成为现实<sup>[75]</sup>。

## 参考文献

- 1 北京农业大学. 家畜繁殖学. 第2版. 北京: 农业出版社, 1986. 135166.
- 2 桑润滋. 动物繁殖生物技术. 北京: 中国农业出版社, 2002. 189210.
- 3 中国科学技术情报研究所重庆分所. 家畜繁殖技术进展. 重庆: 科学技术文献出版社重庆分社, 1979. 178.
- 4 Polge C, Smith AV, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature*, 1949; 164: 666.
- 5 Stewart D L. Storage of bull spermatozoa at low temperatures. *Vet Rec*, 1951, 63: 6566.
- 6 陈丽梅, 郑鸿培. 我国牛冷冻精液的发展历史及现状分析. *畜禽业*, 2001, (11): 3839.
- 7 Correa, Pace, Zavos. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination. *Reprod Fertil*, 1998, 20: 101-107.

- nation program. *Theriogenology*, 1997, 48: 721731.
- 8 王 琨, 艾 群, 蔺志刚. 用精子异种穿卵方法检测牛冷冻精液精子的质量. *中国奶牛*, 2002, (2): 3233.
  - 9 陶 勇, 经荣斌. 家畜精液冷冻保存技术的研究综述. *国外畜牧学·猪与禽*, 1999, (6): 3942.
  - 10 Leeuw, Haring, Kaal-Lansbergen, et al. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. *Theriogenology*, 2000, 54(4): 5767.
  - 11 Bousseau, Brillard, Marquant-Le Guienne, et al. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*, 1998, 50(6): 699706.
  - 12 Thun, Maria Hurtado, Janett, et al. Comparison of Biocipho-PlusR and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*, 2002, 57(6): 10871094.
  - 13 Moussa, Martinet, Trimeche, et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method; cyoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 2002, 57: 16951706.
  - 14 Nabiev, Gilles Schneider, et al. Comparison of AndroMed and TRIS egg yolk extender bovine post-thaw sperm function parameters and in vitro fertility. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 226.
  - 15 Aires Hirsch, Mueller-schloesser, et al. In vitro and in vivo comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of bovine semen. *Theriogenology*, 2003, 60: 269279.
  - 16 谢成侠. 家畜繁殖原理. 南京: 江苏科学技术出版社, 1983. 401419.
  - 17 Rasul, Anzar, Jalali, et al. Effect of buffering systems on post-thaw motion characteristics plasma membrane integrity, and acrosome morphology Of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 2000, 59: 3141.
  - 18 董雅娟, 柏学进, 薛建华, 等. 牛细管精液简易制作技术的试验. *黑龙江畜牧科技*, 1995, (2): 46.
  - 19 许典新, 韩建德, 陆荣志, 等. 提高水牛受胎率的综合技术措施. *中国兽医学报*, 2002, (4): 401402.
  - 20 Woelders Matthijs, Engel. Effects of Trehalose and Sucrose, Osmolality of the Freezing Medium, and Cooling Rate on viability and Intactness of Bull Sperm after Freezing and Thawing. *Cryobiology*, 1997, 35: 93105.
  - 21 赵家才. 关于提高牛冷冻精液质量的研究. *畜禽业*, 1999, (8): 1819.
  - 22 张振中, 陈秀英, 周亚惠, 等. 应用植物抗冻剂冷冻牛和绵羊精液的效果. *黑龙江动物繁殖*, 1996, 4(3): 1214.
  - 23 王 锋, 王元兴, 吴结革, 等. 乙二醇、丙二醇对牛冻精效果的影响. *黑龙江动物繁殖*, 1998, 6(4): 1112.
  - 24 李云龙, 刘春巧. 动物发育生物学. 济南: 山东科学技术出版社, 2003. 682.
  - 25 Kommisrud, Graffer, Steine. Comparison of two processing systems for bull semen with regard to post-thaw motility and nonreturn rates. *Theriogenology*, 1996, 45: 15151521.
  - 26 Visser, Laak, Jansen, et al. Failure of antibiotics gentamycin, tylosin, lincomycin and spectinomycin to eliminate *Mycoplasma bovis* in artificially infected frozen bovine semen. *Theriogenology*, 1999, 51: 689697.
  - 27 张文举, 杨军祥, 黄全成, 等. 谷胱甘肽提高牛冻精活力及受胎率的研究. *甘肃畜牧兽医*, 1997, (2): 1213.
  - 28 Fabbrocini, Sorbo, Fasano, et al. Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of Mediterranean Buffalo (*B. bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology*, 2000, 54(4): 193207.
  - 29 Bilodeau, Blanchette, Comier, et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender; protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, 2002, 57: 11051122.
  - 30 Bilodeau, Blanchette, Gagnon, et al. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, 2001, 56(2): 275286.
  - 31 Kobayashi, Sasaki, Watanabe, et al. Effect of lactoferrin on motility and capacitation of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 462.
  - 32 Foote, Brockett, Kaproth, et al. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. *Animal Reproduction Science*, 2002, 71: 1323.
  - 33 Verberckmoes S, I De Pauw, Van Soom A, et al. Comparison of bovine sperm quality after 6 days of storage in Caprogen or CEP-diluter. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 231.
  - 34 王自科. 胚胎移植的夏洛来种公牛精液冷冻试验. *内蒙古畜牧科学*, 2002, (4): 35.
  - 35 和协超, 沈 放, 季维智, 等. 电刺激采集大额牛精液及其超低温冷冻的初步研究. *兽类学报*, 2000, 20(3): 239240.
  - 36 白从义. 丹麦红牛颗粒冷冻精液制作试验报告. *黄牛杂志*, 1994, (2): 4648.
  - 37 金 花, 乌 兰, 杜拉提, 等. 细管冻精有效精子数与受胎效果观察. *新疆畜牧业*, 1998, (2): 26.
  - 38 李玉凡. 维生素 B<sub>12</sub> 对牛冷冻精液精子质量的影响. *河北职业技术学院学报*, 1998, 12(1): 4042.
  - 39 王 锋, 王元兴, 毛胜勇, 等. 脱脂乳与常乳在牛冷冻精液中的应用研究. *中国奶牛*, 1999, (1): 3940.
  - 40 许典新, 黄日辉, 梁云斌, 等. 牛冷冻精液人工授精技术. *广西畜牧兽医*, 2002, (3): 1618.
  - 41 Liu, Foote, Brockett. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolality. *Cryobiology*, 1998, 37: 219230.
  - 42 金穗华. 我国牛细管精液的推广与存在问题. *畜牧与兽医*, 1998, 30(6): 261262.
  - 43 王元兴, 袁肇汕, 齐 明, 等. 磁平衡对牛冷冻精液质量的影响. *畜牧与兽医*, 1996, 28(5): 210211.
  - 44 肖 清. 牛冷冻精液生产过程中的质量控制. *云南畜牧兽医*, 2000, (2): 34.
  - 45 邢小军, 渊锡藩, 张一玲. 牛精液冷冻速率的影响因素. *畜牧兽医杂志*, 1999, (1): 1719.
  - 46 张一玲, 渊锡藩, 邢小军. 我国牛冷冻精液生产工艺温度

- 曲线的现状分析研究. 黄牛杂志, 1994, 20(S2): 3436.
- 47 渊锡藩, 张一玲, 邢小军. 影响精液质量的几个冷冻技术因素. 畜牧兽医学报, 1995, 26(3): 225230.
- 48 郭有贵, 杨成林, 周宁聪, 等. 牛羊精液最适冷冻温度的测定. 中国奶牛, 1994, (4): 3334.
- 49 Sukkato, Thongsodsang Utha, et al. Effects of cooling and warming conditions on post-thawed motility and fertility of cryopreserved buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 2001, 67(3): 6977.
- 50 赵来珍, 刘发理. 牛冷冻精液精子复苏规律及其机理. 黄牛杂志, 1994, 20(32): 37.
- 51 胡振尉, 诸天海, 陈锡华. 牛精液超长期保存技术的研究. 黄牛杂志, 1998, 24(6): 1718.
- 52 Bielanski, Bergeron, Lau, et al. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology*, 2003, 46: 146152.
- 53 张洪国, 陆书峰, 廖丽萍. 西门塔尔牛细管冻精体内解冻提高黄牛受胎率试验. 黄牛杂志, 1999, 25(3): 2930.
- 54 王守岩, 刘广文, 王 喆. 奶牛细管冷冻精液体内解冻与其受胎率关系的研究. 内蒙古畜牧科学, 2001, 22(6): 10-11.
- 55 张嘉保, 周 虚. 动物繁殖学. 长春: 吉林科学技术出版社, 1999. 120148.
- 56 王英智, 王思珍, 李曙光, 等. 解冻温度对颗粒冷冻精液品质影响的初步研究. 哲里木畜牧学院学报, 1998, 8(2): 14-16.
- 57 闫灵奇, 张红艳, 吕桂香, 等. 筛选牛冷冻精液解冻剂提高牛准胎率. 畜禽业, 1997, (9): 37.
- 58 高宏宝, 赵文奎. 用含糖成分的解冻液解冻牛颗粒冷冻精液的效果试验. 上海畜牧兽医通讯, 1996, (4): 4.
- 59 丁家桐, 师蔚群, 徐巧琴. 维生素 B-(12)解冻牛冷冻精液探析. 上海畜牧兽医通讯, 1999, (1): 79.
- 60 覃波涛. 利用 VB-(12)与 0.9% NaCl 溶液替代解冻液解冻牛冷冻颗粒精液的试验报告. 当代畜牧, 1999, (5): 18.
- 61 管 艺, 张红丽, 马国锋. 牛冷冻精液解冻后有效活力存放时间试验报告. 黄牛杂志, 1995, 21(4): 18.
- 62 Whitfield, Parkinson. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). *Theriogenology*, 1995, 44: 413422.
- 63 Pereira, Tuli, Wallenhorst, et al. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. *Theriogenology*, 2000, 54: 185192.
- 64 Correa Zavos. Preparation and recovery of frozen-thawed bovine spermatozoa via various sperm selection techniques employed in assisted reproductive technologies. *Theriogenology*, 1996, 46: 12251232.
- 65 文国艺. 咖啡因预处理解冻精液对牛体外受精的影响. 西南农业学报, 2000, 13(2): 9598.
- 66 张永春, 赵雪秋, 满初日嘎, 等. 利用猪皮浸出液保存解冻后牛颗粒冷冻精液的研究. 中国奶牛, 2001, (4): 3536.
- 67 余国富. 提高黄牛冷配受胎率的技术要点. 贵州畜牧兽医, 2002, (6): 27.
- 68 Senger, Becker, Davidge, et al. Influence of comeal insemination on conception in dairy cattle. *J Anim Sci*, 1988, 66: 30103016.
- 69 Dalton, Nadir, Barne, et al. Effect of a deep uterine insemination on spermatozoal accessibility to the ovum in cattle. *Theriogenology*, 1999, 51: 883890.
- 70 杨卫东, 许荣亮. 提高牛冷冻精液人工配种受胎率初探. 湖南畜牧兽医, 2000, (3): 1416.
- 71 陈静波. 牛冷冻精液配种技术操作中存在的问题及改进措施. 黄牛杂志, 2001, 27(3): 5860.
- 72 Foulkes Stewart. Artificial insemination of cattle using varying numbers of spermatozoa. *The Veterinary Record*, 1977, 101(10): 205.
- 73 Penfold, Game, Donoghue, et al. Comparative viability of bovine sperm frozen on a cryomicroscope or in straws. *Theriogenology*, 1997, 47: 521530.
- 74 刘彩兰, 郝爱玲, 施维民, 等. 谈牛冷冻精液质量检测技术问题. 中国奶牛, 1997, (3): 3536.
- 75 Schenk, Sub, Cran, et al. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 1999, 52(8): 13751389.

(责任编辑: 邓大玉 韦廷宗)

(上接第 369 页 Continue from page 369)

- 53 Kraus O, Kraus M. On myriapod/ insect interrelationships. *Mem Mus Nat Hist Natl*, 1996, 169: 283290.
- 54 Kraus O. Phylogenetic relationships between higher taxa of tracheate arthropods. In: Fortey R A, Thomas R H, eds. *Arthropod relationships*. Chapman & Hall, London, 1998. 295-303.
- 55 Bouucki H. Evolution und Phylogenetisches system der Chilopoda (Mandibulata, Tracheata). *Abhandl Berhandl Naturwiss Ver Hamburg*, 1996, 35: 95226.
- 56 Strausfeld N J. Crustacean-insect relationships; the use of brain characters to derive phylogeny amongst segmented invertebrates. *Brain Behav Evol*, 1998, 52: 186206.
- 57 Crouau Y. Mechanosensitive cells of Hexapods crustaceans and myriapods setae; a comparison under phylogenetic aspects. *Ann Soc Entomol Fr*, 2001, 37: 233242.

(责任编辑: 邓大玉)