

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.05.009

饲养条件对水牛精液品质及精浆代谢物的影响分析

孙乐¹, 刘瑞鑫², 许春荣²,
许鹏², 石德顺¹, 李湘萍¹

1. 广西大学 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530004;
2. 广西壮族自治区畜禽品种改良站, 南宁 530001

摘要: 为了解饲养条件对意大利地中海种公牛精液品质及精浆代谢产物的影响, 首先分析了青贮和青绿饲养条件下地中海种公牛的精液品质及生化指标, 而后采用超高效液相色谱-串联质谱技术对种公牛精浆进行非靶向代谢组分析。结果显示: 与青贮饲料组相比, 青绿饲料组种公牛精子活力和采精量显著升高、畸形率显著下降($p < 0.05$), 精液 pH 值和密度没有显著差异($p > 0.05$)。青绿饲料组种公牛精子直线速度、曲线速度、平均速度、鞭打频率均显著升高($p < 0.05$), 精子直进性和直线性极显著升高($p < 0.01$), 头部振幅没有显著差异($p > 0.05$); 青绿饲料组种公牛精浆中镁(Mg^{2+})、果糖(Fructose)含量均显著升高($p < 0.05$), 钾(K^+)、睾酮(T)、 α -葡萄糖苷酶(α -Glu)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢同工酶(LDH)含量极显著升高($p < 0.01$), 钠(Na^+)含量差异不显著($p > 0.05$)。精浆代谢成分分析结果显示, 本次组学数据共匹配出 677 个不同代谢物, 筛选得到 10 种差异代谢物, 它们参与了 9 条代谢通路。以上结果说明, 营养条件的改变会对种公牛精液质量和生理代谢产生影响, 并影响精浆代谢特征。

关键词: 意大利地中海种公牛; 饲养条件; 精液品质; 生化指标; 精浆代谢组学

中图分类号: S823.8⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)05-0069-08

种公牛精液品质的好坏会直接影响到精液的生产、种公牛的繁殖性能以及畜禽品改站的经济效益。影响精液品质的因素有很多, 包括温度、品种、营养条件、饲养管理等。有研究报道精液生产能力主要取决于环境, 其中最主要的是饲养管理条件^[1-3]。目前, 有关营养条件的研究集中于饲养后生理和生化指标的检测, 通过这些指标来反映营养条件改变给动物机体带来的影响。有研究在饲料中添加 Penergetic-T 后分析其对瘤胃液和血液生化指标的影响, 以反映饲料添加剂对延边黄牛育肥的促进作用^[4]。改善日粮比例, 如在饲料中添加益生菌可降低肉鸡料肉比^[5], 提高断奶仔猪生长性能^[6], 促进 0~8 月龄犏牛日增质量^[7], 提高和牛种公牛的精液品质^[8], 此外, 有学者在研究不同日粮对冬季摩拉、尼里/拉非种公牛冻精的影响时, 提出青绿饲料对提高种公牛的精液品质有重要作用^[9-10]。

代谢组学可以对某一生物体组份或细胞在特定生理时期或条件下所有代谢产物同时进行定性和定量分析, 以寻找目标差异代谢物、进而研究机体代谢特征。代谢组研究在动物健康评估、疾病诊断、生物产品质量方面发挥了重大作用^[11-13]。Beauclercq 等^[14]通过代谢组学找出了 15 种可能影响鸡肉品质的标志代谢物。

收稿日期: 2021-01-19

基金项目: 广西创新驱动发展专项(AA17204051); 广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA238039); 2020 年度第八批南宁市特聘专家项目。

作者简介: 孙乐, 硕士研究生, 主要从事动物生殖生理研究。

朱坤等^[15]指出饲喂发酵饲料影响了育肥猪血清中 L-焦谷氨酸、黄嘌呤、丙烯酰胺等代谢物的含量,揭示了饲喂不同饲料会造成育肥猪血清代谢水平的改变. 赵文华等^[16]通过代谢组学研究揭示了 γ -氨基丁酸、组氨酸和甜菜碱对茶花鸡胸肌和腿肌的特殊风味具有决定作用. Li 等^[17]利用代谢组学技术分析不同泌乳期的牦牛乳腺组织代谢变化,发现受影响的代谢途径是甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸;三羧酸循环(TCA)等代谢途径,为牛乳腺发育和泌乳相关的代谢研究提供了重要的支撑. 目前有关精浆代谢组学分析较少,罗芳等^[18]在筛选表征种公牛精液活力生物标志物的实验中,采集 24 头西门塔尔种公牛的精液进行超高效液相色谱-质谱联用检测,发现精浆中的鞘氨醇、环己胺、戊酸等 6 个代谢物可作为表征种公牛精液活力的潜在生物标志物. Ugur 等^[19]使用气相色谱-质谱联用技术对不同冷冻性荷斯坦种公牛精浆中的氨基酸含量进行了定量分析,发现牛精浆中谷氨酸、丙氨酸和甘氨酸是主要代谢产物,同时发现苯丙氨酸可以作为一种可冷冻的生物标志物.

意大利地中海奶水牛是产奶性能最好的河流型水牛品种,同时也是目前世界上针对乳用性能选育程度较高的一个品种. 随着奶水牛市场需求的不断扩大,为提高本地水牛的产奶量和奶质量,广西壮族自治区引进了意大利地中海种公牛,以期对广西本地水牛进行品种改良. 基于营养条件可能会影响种公牛精液品质,同时有关水牛精浆代谢成分研究尚为空白的前提,本研究主要分析不同饲养条件下种公牛精液质量、生化指标及精浆代谢物,并筛选出不同营养条件下的差异代谢物,以期为进一步选择优质饲料饲喂种公牛,提高精液产量和质量提供一定的科学依据.

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验用意大利地中海种公牛,饲养在广西壮族自治区畜禽品种改良站种公牛站. 试验动物按照广西畜禽品种改良站种公牛饲养与管理的相关条例进行饲养. 根据采精和冻精生产记录,选择采精正常、体况良好的种公牛为试验牛. 分为饲喂青绿饲料 GF 组、青贮饲料 S 组. 采集不同饲养条件下的精液样本,取回的精液进行离心,分离后的精子和精浆进行分装,冷冻于液氮中,随后放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用.

1.2 主要试剂

伊红染液、磷酸盐缓冲液(PBS)、生育酚乙酸酯、甲醇、酶联免疫分析(ELISA)试剂盒牛甘油三酯(TG)、牛睾酮(T)、牛碱性磷酸酶(ALP)、牛酸性磷酸酶(ACP)、牛果糖(fructose)、牛 α 葡萄糖苷酶(α -Glu)、牛乳酸脱氢同工酶(LDH)均购自上海酶联生物科技有限公司;钾(K)测定试剂盒、镁(Mg)测定试剂盒、钠(Na)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所.

1.3 主要仪器、设备

精子分析仪 WLJY-9000 型(富士平工业株式会社), $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 离心过滤柱, C18 色谱柱, 液相色谱仪器 UltiMate3000(Dionex), 包括液相泵(HPG-3400 SD)、柱温箱(TCC-3000 SD)和自动进样器(WPS-3000SL), 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱仪 Q-Exactive(Thermo Scientific).

1.4 实验方法

1.4.1 精液品质常规检测

精子活力检测:在显微镜下用精液质量检测系统进行分析,每个样本重复计数 3 次并记录结果. 精子畸形率检测:采用伊红染色法进行精子畸形观察. 采精量检测:利用电子分析天平记录射精量. 精液 pH 值检测:利用 pH 试纸与标准比色卡对比得出 pH 值. 计算机辅助精子分析仪检测:取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 精液, $8\text{ }\mu\text{L}$ PBS 洗液,混匀后上机检测,利用精子分析仪对种公牛精子进行运动参数分析.

1.4.2 意大利地中海种公牛精浆生化指标检测

按照试剂盒说明书方法测定意大利地中海种公牛精浆的生化指标.

1.4.3 意大利地中海种公牛精浆非靶向代谢组学检测

(1) 精浆代谢物的提取

取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 分离得到的精浆样本,加入 $148\text{ }\mu\text{L}$ 甲醇, $2\text{ }\mu\text{L}$ 内标(生育酚乙酸酯)至 1.5 mL 离心过滤器,

涡旋 30 s, 沉淀蛋白, 4 °C 离心 12 000 r/min, 15 min, 取出过滤柱。

(2) QC 样品制备

质量控制样本(QC)为精浆提取物的混合液, 每 6 个检测的样本插入一个 QC 样本, 用来校正仪器的稳定性。

(3) 超高效液相色谱-串联质谱检测

液相色谱条件如下: 色谱柱柱温 30 °C, 自动进样器 4 °C, 正离子(ESI+)模式下流动相 A 为 0.1% 的甲酸水溶液, 流动相 B 为甲醇, 进样体积为 1 μ L, 负离子模式其他条件不变, 只改变模式为负离子(ESI-)。样品梯度洗脱程序参考实验平台方法。质谱条件: 离子源为 Q-Exactive 质谱仪, 加热型电喷雾, 温度 300 °C, 正、负离子模式下喷雾电压均为 3.0 kV, 传输毛细管温度为 320 °C, 鞘气和辅助气流压力分别为 30 psi(206.84 kPa), 10 psi(68.95 kPa); 质谱扫描范围为 80~1 200 m/z(质子与电荷数的比值), 扫描模式: Full MS/dd-MS₂。

1.5 数据统计分析

对数据指标进行统计分析, 结果均以“平均值±标准差”表示, 利用 GraphPad Prism 6.0 进行图片整理并进行差异显著性分析, * * 表示 $p < 0.05$ 差异显著, * * * 表示 $p < 0.01$ 差异极显著。

2 结果与分析

2.1 种公牛精液常规检测

与青贮饲料组相比, 青绿饲料组种公牛精子活力和采精量显著升高, 畸形率显著下降($p < 0.05$), 精液 pH 值和密度没有显著差异($p > 0.05$)。青绿饲料组精子直线速度(VSL)、曲线速度(VCL)、平均速度(VAP)、鞭打频率(BCF)均显著升高($p < 0.05$), 精子直进性(LIN)和直线性(STR)极显著升高($p < 0.01$), 头部振幅(ALH)没有显著差异($p > 0.05$)(表 1)。

表 1 种公牛精液质量参数

精液指标	青绿饲料组(GF)	青贮饲料组(S)	p 值
精子活力	0.64±0.14* *	0.45±0.25	$p < 0.05$
精液 pH 值	6.55±0.19	6.65±0.12	$p > 0.05$
精子畸形率/%	10.25±3.40* *	13.94±3.56	$p < 0.05$
采精量/mL	6.80±1.19* *	4.95±2.28	$p < 0.05$
精子浓度/(亿·mL ⁻¹)	14.43±4.53	13.39±2.83	$p > 0.05$
VSL/(m·s ⁻¹)	29.69±7.77* *	21.45±7.93	$p < 0.05$
VCL/(m·s ⁻¹)	129.93±25.97* *	94.37±43.28	$p < 0.05$
VAP/(m·s ⁻¹)	63.94±14.49* *	45.46±20.45	$p < 0.05$
LIN/%	0.26±0.04* * *	0.20±0.01	$p < 0.01$
STR/%	0.47±0.04* * *	0.40±0.03	$p < 0.01$
ALH/m	4.17±0.17	3.46±1.34	$p > 0.05$
BCF/Hz	8.94±0.63* *	8.28±0.51	$p < 0.05$

2.2 种公牛精浆生化指标分析

与青贮饲料组相比, 青绿饲料组种公牛精浆中镁(Mg²⁺)、果糖(Fructose)含量均显著升高($p < 0.05$), 钾(K⁺)、睾酮(T)、 α -葡萄糖苷酶(α -Glu)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢同工酶(LDH)含量极显著升高($p < 0.01$), 钠(Na⁺)含量差异不显著(图 1)。

2.3 精浆非靶向代谢组学分析

在正离子模式和负离子模式下, 本次实验共检测到 2 434 个峰值。代谢组学原始数据采用 Compound discover 3.0 软件进行峰对齐、保留时间校正以及提取代谢物峰面积计算, 同时去除相对标准偏差(RSD)大于 30%的代谢物。通过代谢物数据库 mzCloud, HMDB 和 KEGG 匹配检索, 一共匹配出 677 个不同的代谢物。

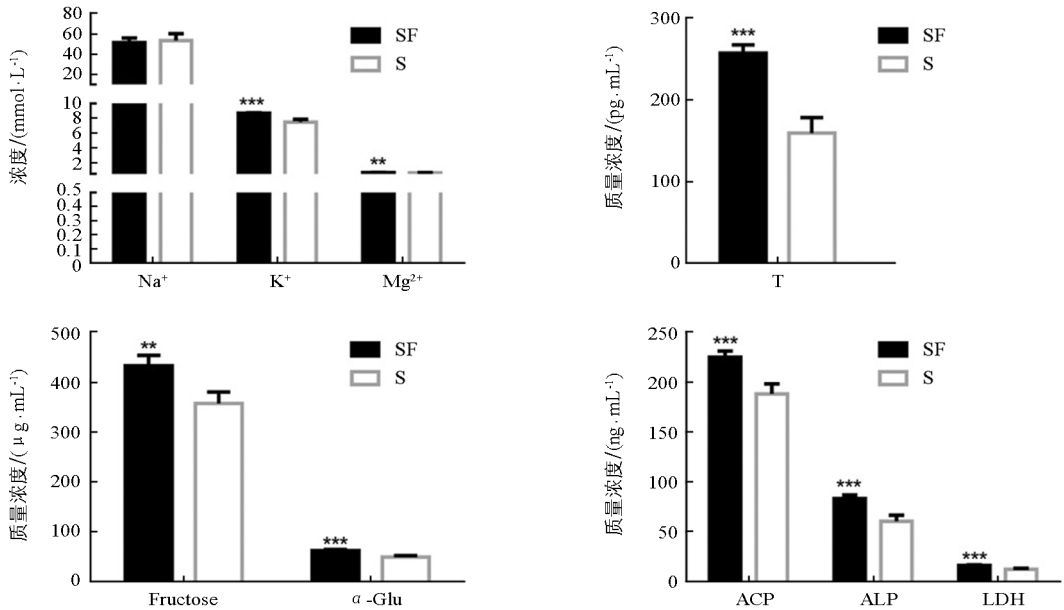
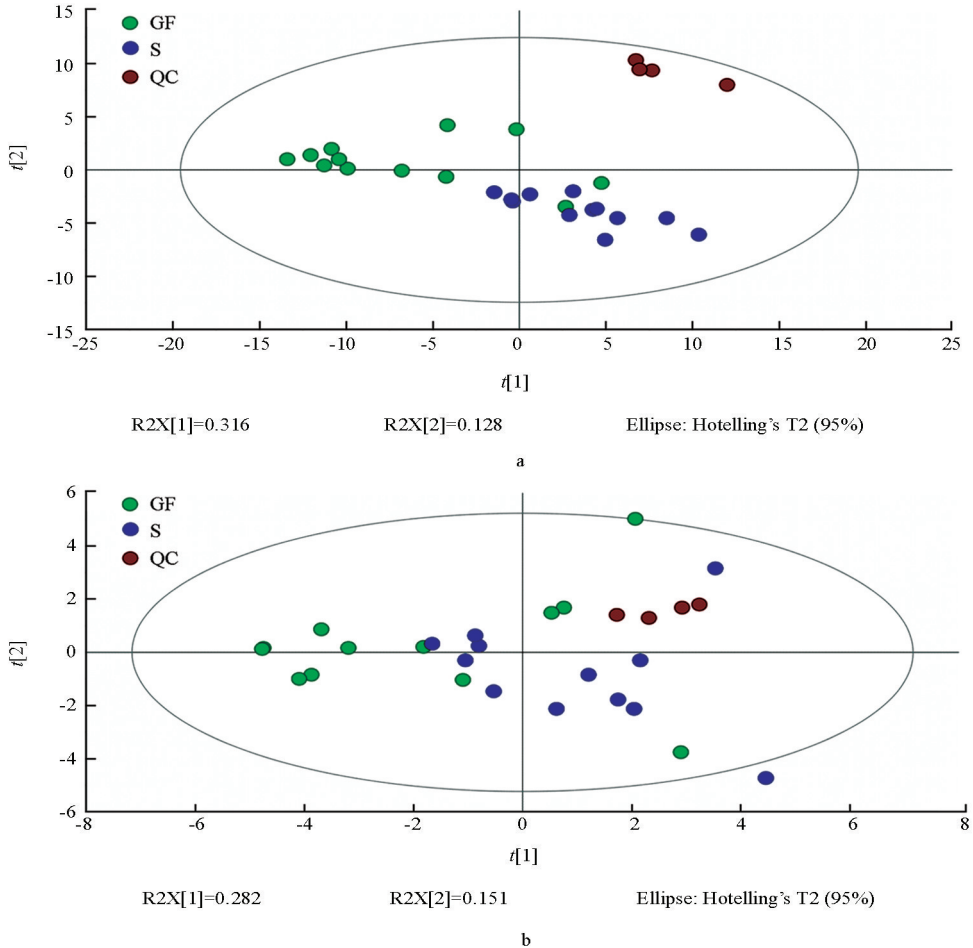


图 1 精浆生化指标在两组中的含量

2.3.1 精浆代谢物分析

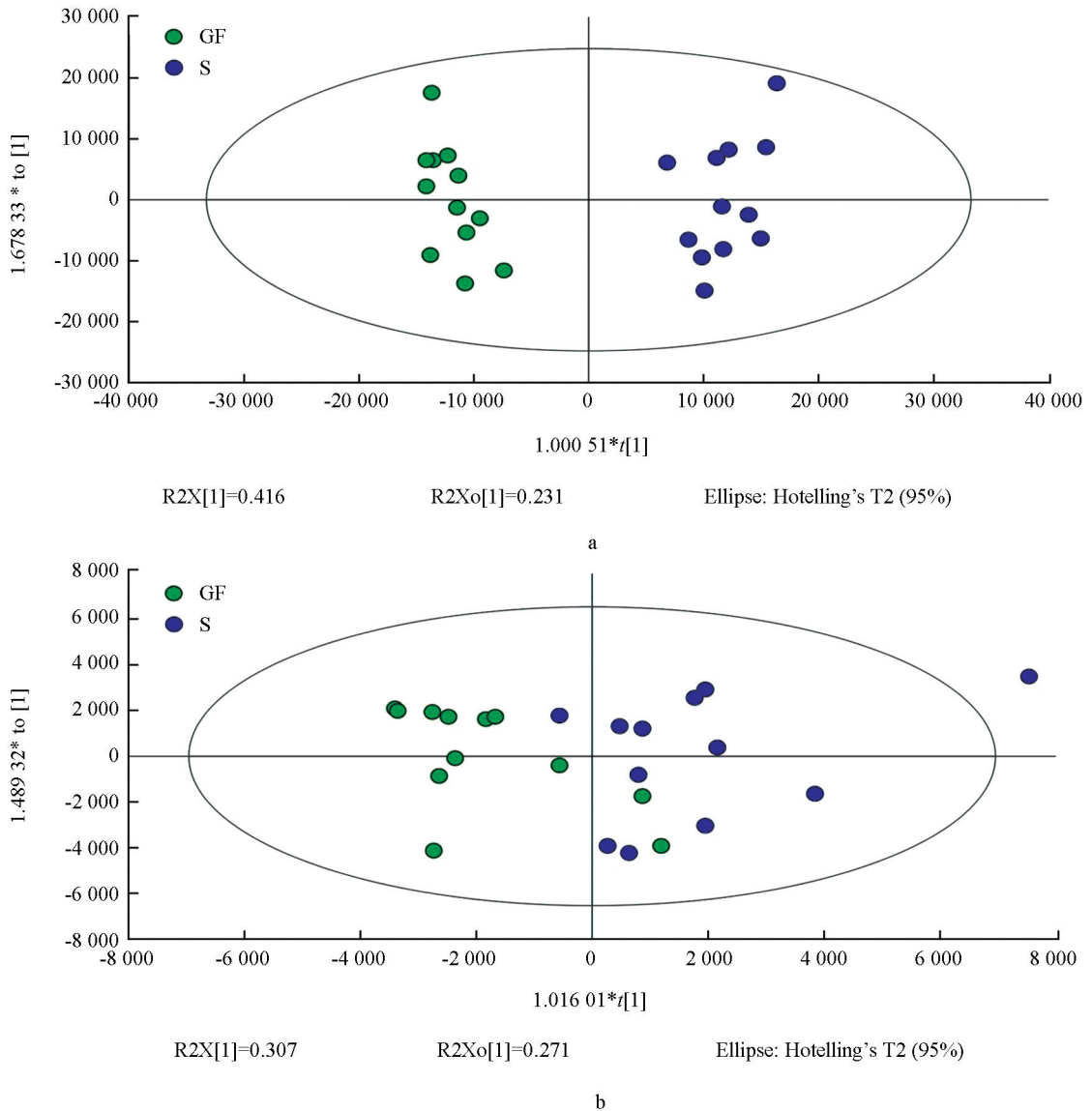
从主成分分析(PCA)得分图可知,本次实验 QC 样品分布良好,说明所用仪器重复性及稳定性均好,同时不同组间有明显的分布趋势(图 2)。



$t[1]$ 是针对预测主成分的回归系数权重大小, $t[2]$ 是针对正交主成分的回归系数权重大小。

图 2 总体样本的 PCA 分析图: a, b 分别为正、负离子模式下的 PCA 得分图

对代谢物进行正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)以区分组, 在正、负离子模式下的模型示意图说明模型稳定可靠性. 对所建立的 OPLS-DA 模型进行置换检验, 也表明本文所建立的模型有效并且未发生过拟合(图 3).



$t[1]$ 是第一预测主成分, $to[1]$ 是第一正交主成分.

图 3 OPLS-DA 得分图: a,b 分别为正负离子模式下的 OPLS-DA 得分图

2.3.2 精浆差异代谢物的筛选及代谢途径分析

根据 $p < 0.05$, $VIP > 1$ 且差异倍数 FC 值大于 1.3 或者差异倍数 FC 值小于 0.7, 共筛选出 10 个差异代谢物: 左旋乙酰肉碱、甘油磷酸胆碱、3-丁酸巯基己酯、3-氧戊二酸、甜菜碱、5-甲基胞苷、2,5-咪喃二甲酸、柠檬酸、磷脂酰胆碱和柠檬酸. 对差异代谢物进行代谢途径分析, 发现差异代谢物参与 9 条代谢途径: 甘油磷脂代谢, 亚油酸代谢, α -亚麻酸代谢, 醚脂质代谢, 三羧酸循环, 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢, 乙醛酸和二羧酸酯代谢, 甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢, 花生四烯酸代谢.

3 讨论与结论

本文的目的是了解在不同饲养条件下种公牛精液质量和精浆代谢的差异. 研究发现, 与青贮饲料组相比, 青绿饲料组种公牛精子畸形率低、活力高, 精液品质好. 同时, 本实验对青绿饲料组和青贮饲料组种公牛的精浆样本进行了超高效液相色谱-串联质谱分析, 通过差异分析和代谢途径分析, 筛选出了 10 种差异

代谢物, 富集到 9 个代谢途径。

精浆中包含糖类、脂类、蛋白质和氨基酸等物质。在不同生理状态下, 能量、蛋白质、矿物质和维生素等对公畜生殖能力的维持起到重要作用。精浆内的微量元素与精子功能有关, 钠、钙、镁和钾水平与精子活动率呈正相关。在本研究中, 与青贮饲料组相比, 青绿饲料组精浆中 Mg 离子显著升高, K 离子变化极显著升高, Na 离子差异不显著, 这一点与之前的研究一致^[20-21]。睾酮影响精子形成并促进附睾中的精子成熟^[22]。种公牛精浆中睾酮含量极显著升高, 也说明睾酮含量对于精子成熟十分重要。精浆中的糖类是精子能量代谢的重要底物, 尤其果糖是精子能量代谢的主要来源, 其代谢能为精子运动供应腺嘌呤核苷三磷酸(ATP), 同时经糖酵解和线粒体呼吸作用产生的 ATP 为精子的运动提供能量^[23]。果糖水平升高, 意味着供能物质充足, 有利于代谢。哺乳动物精液中中性 α -葡萄糖苷酶几乎完全来源于附睾, 与获得受精能力相关, 同时作为附睾精子成熟的调节剂^[24-25]。中性 α -葡萄糖苷酶活性与常规精子参数呈正相关, 在本研究测得的指标中睾酮、果糖和 α -葡萄糖苷酶在青绿饲料组极显著升高, 可以发现不同饲料对精子的成熟和能量代谢产生了一定的影响。

精浆中的肉碱主要由附睾分泌, 精浆中肉碱分为游离肉碱和乙酰肉碱两种。左旋肉碱为精子的运动提供能量, 并且可以帮助细胞内 DNA 修复和支持细胞的新陈代谢^[26]。左旋肉碱和乙酰左旋肉碱对弱精子症具有辅助治疗效果, 能提高患者的精液质量^[27]。还有研究发现, 乙酰肉碱含量与总运动形态正常的精子数呈正相关, 口服左旋肉碱的种马可改善精子的动力学和形态学特征^[28], 可见左旋乙酰肉碱对保持精子的正常形态和活力有一定的影响。在实验中的质谱分析可以发现, 左旋乙酰肉碱在青绿饲料组中含量高, 同时青绿饲料组精子活力也高, 这表明左旋乙酰肉碱与精子的活力有一定的关系。

甘油磷酸胆碱(GPC)是存在于雄性生殖系统中的一种主要成分, 绝大部分由附睾上皮合成与分泌, 有研究指出精浆 GPC 量约占人体内 GPC 总量的 70% 以上, 是检验雄性生殖能力的指标之一, 并且 GPC 参与精子运动的调节及吸呼活动, 精子膜 GPC 含量与附睾功能具有密切的联系^[29-30]。磷脂酰胆碱属于卵磷脂的一种, 卵磷脂经常用于冷冻精液保存。甜菜碱是一种生物碱, 与叶酸一起参与碳代谢, 它可以通过清除超氧化物来提高睾丸组织的抗氧化能力, 并且可以通过甜菜碱循环产生 S-腺苷甲硫氨酸来提高精子运动能力和精子功能。于炎巧^[31]研究发现甜菜碱能够提高精子数量, 改善精子活力, 且不会改变精子的畸形率。此外, 其他代谢物如 5-甲基胞苷常存在于细胞的 RNA 中, 是一种稀有核苷。2, 5-咪喃二甲酸可进行糖醛降解, 产生能量和生成 α -酮戊二酸, 为 TCA 循环增加底物。3-丁酸巯基己酯是脂肪酸酯类有机化合物, 它是脂肪酸的羧酸酯衍生物。在实验中的质谱分析可以发现, 上述的甘油磷酸胆碱、磷脂酰胆碱、甜菜碱、5-甲基胞苷、2, 5-咪喃二甲酸和 3-丁酸巯基己酯, 在青绿饲料组中的含量高。

柠檬酸是三羧酸循环过程中的重要物质, 三羧酸循环是基本的代谢途径, 为相关代谢提供能量和前体, 保证各种生物功能正常进行, 同时在精子激活和运动期间产生能量^[32-33], 如精子在附睾内的成熟过程中主要是通过代谢来提供能量, 精浆内的柠檬酸含量可以在一定程度上反映精子的活力。柠檬酸是精浆中重要的生化成分, 不仅能够恢复前列腺的状态, 在精子活力中还起着至关重要的作用^[34]。精浆中的柠檬酸主要来自前列腺, 可以调节酸碱度, 同时影响精液质量。Kumar 等^[35]利用质子核磁共振技术对高繁殖力和低繁殖力种公牛精浆和血清中的代谢产物进行研究, 发现精浆中的柠檬酸与种公牛生育能力有关。在实验中的质谱分析发现, 柠檬酸在青绿饲料组中的含量较高, 这可能与精浆中的能量代谢相关。

本研究结果说明, 营养条件的改变会对意大利地中海种公牛精液质量和生理代谢产生影响, 并影响精浆代谢水平。

参考文献:

- [1] 金穗华, 王鹏武, 马国辉. 影响公牛精子形态异常的原因分析 [J]. 畜牧兽医杂志, 2015, 34(5): 19-21.
- [2] 张海涛, 刘玉, 张晓霞, 等. 影响公牛精液产量的因素及应对措施 [J]. 中国奶牛, 2006(10): 21-23.
- [3] 张黎黎, 李元浩, 刘爱国, 等. 饲养管理水平与种公牛精液质量的关系 [J]. 吉林畜牧兽医, 2013, 34(4): 51-52.
- [4] 田全召, 高汉婷, 刘修生, 等. 饲料中添加 Penergetic-T 对种公牛精液品质的影响 [J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55(6): 120-123.

- [5] 王允超,岳寿松,彭虹旒,等. 在降低代谢能日粮中添加微生态制剂对肉鸡生产性能的影响 [J]. 饲料工业, 2008(4): 45-46.
- [6] 刘虎传,张敏红,冯京海,等. 益生菌制剂对早期断奶仔猪生长性能和免疫指标的影响 [J]. 动物营养学报, 2012, 24(6): 1124-1131.
- [7] 符运勤,刁其玉,屠焰,等. 不同组合益生菌对0~8周龄犊牛生长性能及血清生化指标的影响 [J]. 动物营养学报, 2012, 24(4): 753-761.
- [8] 张智慧,李伟,赵金波,等. 复合益生菌对和牛种公牛精液品质及生殖激素的影响 [J]. 饲料研究, 2020, 43(8): 19-22.
- [9] 李芳芳,李美珍,潘堂峰,等. 广西冬季不同日粮对摩拉、尼里/拉非种公牛冻精畸形率和活力的影响 [J]. 畜牧与兽医, 2017, 49(9): 42-45.
- [10] 张瑞璋,刘冰,王红艺. 青绿饲料对种公牛精液品质的影响 [J]. 黄牛杂志, 1994(3): 53-54.
- [11] DING S, FANG J, LIU G, et al. The Impact of Different Levels of Cysteine on the Plasma Metabolomics and Intestinal Microflora of Sows from Late Pregnancy to Lactation [J]. Food & Function, 2019, 10(2): 691-702.
- [12] ARTEGOITIA V M, FOOTE A P, LEWIS R M, et al. Metabolomics Profile and Targeted Lipidomics in Multiple Tissues Associated with Feed Efficiency in Beef Steers [J]. ACS Omega, 2019, 4(2): 3973-3982.
- [13] JIE G, PEIGE Y, YANJUN C, et al. Identification of Metabonomics Changes in Longissimus Dorsi Muscle of Finishing Pigs Following Heat Stress through LC-MS/MS-Based Metabonomics Method [J]. Animals, 2020, 10(1): 29.
- [14] BEAUCLERCQ S, NADAL-DESBARATS L, HENNEQUET-ANTIER C, et al. Serum and Muscle Metabolomics for the Prediction of Ultimate pH, a Key Factor for Chicken-Meat Quality [J]. Journal of Proteome Research, 2016, 15(4): 1168-1178.
- [15] 朱坤,毛胜勇,朱崇森,等. 发酵饲料对育肥猪生长性能、胴体性状、肉品质、血清生化指标和代谢产物的影响 [J]. 动物营养学报, 2018, 30(10): 4244-4250.
- [16] 赵文华,王桂瑛,荀文,等. 基于代谢组学筛选表征茶花鸡肌肉中特征风味的水溶性化合物 [J]. 中国农业科学, 2020, 53(8): 1627-1642.
- [17] LI Z, JIANG M. Metabolomic Profiles in Yak Mammary Gland Tissue During the Lactation Cycle [J]. PloS One, 2019, 14(7): e0219220.
- [18] 罗芳,郭延生,马志远,等. 基于UPLC-Q-TOF MS代谢组学技术筛选表征西门塔尔种公牛精子活力的候选生物标志物 [J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(8): 1596-1606.
- [19] UGUR M R, DINH T, HITIT M, et al. Amino Acids of Seminal Plasma Associated With Freezability of Bull Sperm [J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2019, 7: 347.
- [20] 张瑞生,孙慧谨,郑连文. 男性血液和精液中微量元素含量与精子活力的相关性研究 [J]. 中华男科学杂志, 2010, 16(11): 1019-1022.
- [21] GUSANI P H, SKANDHAN K P, VALSA C, et al. Sodium and Potassium in Normal and Pathological Seminal Plasma [J]. Acta Europaea Fertilitatis, 1992, 23(1): 39-42.
- [22] MCLACHLAN R I, O'DONNELL L, MEACHEM S J, et al. Hormonal Regulation of Spermatogenesis in Primates and Man: Insights for Development of the Male Hormonal Contraceptive [J]. Journal of Andrology, 2002, 23(2): 149-162.
- [23] ZHOU Q, NIE R, PRINS G S, et al. Localization of Androgen and Estrogen Receptors in Adult Male Mouse Reproductive Tract [J]. J Androl, 2002, 23(6): 870-881.
- [24] 金伟,高健刚,李宏军,等. 无精子症患者精浆果糖测定的临床价值研究 [J]. 生殖医学杂志, 2008(4): 269-271.
- [25] DU Y, LIU H, ZHANG M, et al. Taurine Increases Spermatozoa Quality and Function in Asthenospermia Rats Impaired by Ornidazole [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1155: 507-520.
- [26] GARCIA C L, FILIPPI S, MOESSO P, et al. The Protective Effect of L-Carnitine in Peripheral Blood Human Lymphocytes Exposed to Oxidative Agents [J]. Mutagenesis, 2006, 21(1): 21-27.
- [27] 程怀瑾,陈廷. 左旋肉碱和乙酰左旋肉碱复合制剂对特发性弱精子症精子质量的影响 [J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(2): 149-151.
- [28] STRADAIOLI G, SYLLA L, ZELLI R, et al. Effect of L-Carnitine Administration on the Seminal Characteristics of Oligoasthenospermic Stallions [J]. Theriogenology, 2004, 62(3/4): 761-777.
- [29] 丁之德,吴宏伟,鲁梅格,等. 人精浆甘油-3-磷酸胆碱和总唾液酸量变化的研究 [J]. 生殖与避孕, 1994(4): 302-305.

- [30] 丁之德, 王卓群, 吴明章. 大鼠附睾精子膜甘油-3-磷酸胆碱含量变化的研究 [J]. 男性学杂志, 1994(2): 79-82.
- [31] 于炎巧. 口服叶酸与甜菜碱提高小鼠精子质量的作用及机制研究 [D]. 沈阳: 辽宁大学, 2018.
- [32] LIANGUO C, CHAO W W, MING J D, et al. Metabolic and Transcriptional Changes in Seminal Plasma of Asthenozoospermia Patients [J]. Biomedical Chromatography, 2020, 34(3): e4769.
- [33] MARIOLA A D, GRZEGORZ J D, AGNIESZKA M, et al. Motility of Carp Spermatozoa is Associated with Profound Changes in the Sperm Proteome [J]. Journal of Proteomics, 2016, 138: 124-135.
- [34] MARBERGER H, MARBERGER E, MANN T, et al. Citric Acid in Human Prostatic Secretion and Metastasizing Cancer of Prostate Gland [J]. Br Med J, 1962, 1(5281): 835-836.
- [35] KUMAR A, KROETSCH T, BLONDIN P, et al. Fertility-Associated Metabolites in Bull Seminal Plasma and Blood Serum: 1H Nuclear Magnetic Resonance Analysis [J]. Mol Reprod Dev, 2015, 82(2): 123-131.

Effects of Feeding Conditions on Semen Quality and Seminal Plasma Metabolites of Buffalo

SUN Le¹, LIU Rui-xin², XU Chun-rong²,
XU Peng², SHI De-shun¹, LI Xiang-ping¹

1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2. Guangxi Work Station of Livestock & Poultry Breed Improvement, Nanning 530001, China

Abstract: The purpose of this study was to investigate the effects of feeding conditions on semen quality and seminal plasma metabolites of Italian Mediterranean buffalo bulls. Firstly, the semen quality and biochemical indexes of Mediterranean bulls under silage and turquoise feeding conditions were analyzed, and then the seminal plasma of bulls was analyzed by non-targeted metabolomics using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The results showed that compared with those of the silage group, the sperm motility and semen yield of bulls in the green feed group were significantly increased ($p < 0.05$), the deformity rate was significantly decreased ($p < 0.05$), and the semen pH and concentration were not significantly different ($p > 0.05$). The straight-line velocity, curve speed, average speed and whipping frequency of bull sperm in the green feed group were significantly increased ($p < 0.05$), its sperm straightness and linearity frequency had a highly significant increase ($p < 0.01$), while there was no significant difference in head amplitude ($p > 0.05$). In the seminal plasma of bulls in the green feed group, the contents of Mg^{2+} and fructose were significantly increased ($p < 0.05$), and the contents of K^+ , testosterone (T), α -glucoside (α -Glu), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (ALP) and lactate dehydrogenase (LDH) were significantly increased ($p < 0.01$), while Na^+ content was not significantly different ($p > 0.05$). In analysis of seminal plasma metabolic components, 677 different metabolites were matched in the omics data, and 10 different metabolites which were involved in 9 metabolic pathways were screened. The above results indicated that the changes of nutritional conditions may affect the quality of bull semen and physiological metabolism, and the characteristics of seminal plasma metabolism as well.

Key words: Italian Mediterranean bull; breeding condition; semen quality; biochemical indicator; seminal plasma metabolomics