

影响绵羊、山羊超数排卵及胚胎移植效果因素分析

付静涛¹ 朱士恩^{1,2} 余文莉¹ 刘国世¹ 冯建忠³ 张忠诚¹

(1. 中国农业大学 动物科学技术学院, 北京 100094; 2. 中国农业大学 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100094;
3. 天津市畜牧兽医研究所, 天津 300112)

摘要 在生产条件下,对3个优良品种的127只绵羊(道塞特47只、萨福克49只、杜泊31只)和111只波尔山羊供体使用不同国别生产的促卵泡素(FSH)实施超数排卵处理,然后对1231只小尾寒羊和奶山羊受体实施不同方法的胚胎移植,旨在筛选出切合于生产实际成本低、效率高的超数排卵和胚胎移植方案。实验结果表明,使用新西兰产FSH对波尔山羊超数排卵后平均获得可用胚胎14枚/只,显著高于澳大利亚产FSH效果(平均7.59枚/只)($P < 0.05$),而中国科学院产FSH的超排效果(平均10.38枚/只)与新西兰产无显著性差异($P > 0.05$);进一步采用中国科学院产和产新西兰产FSH分别对道塞特、萨福克和杜泊3个品种绵羊实施超数排卵结果,获得平均可用胚胎数均无显著性差异($P > 0.05$);使用腹腔内窥镜法和常规手术法胚胎移植结果表明,移植妊娠率分别为57.44%和60.20%,2种方法间无显著性差异($P > 0.05$)。由于中国科学院产FSH价格便宜,而腹腔内窥镜法胚胎移植可大大缩短操作时间,两者结合可降低成本、提高效率,适宜羊胚胎移植产业化应用。

关键词 绵羊;山羊;超数排卵;胚胎移植;妊娠率

中图分类号 S814.4;S826;S827

文章编号 1007-4333(2005)05-0058-04

文献标识码 A

Factors on superovulation and embryo transfer efficiency in goat and sheep

Fu Jingtao¹, Zhu Shien^{1,2}, Yu Wenli¹, Liu Guoshi¹, Feng Jianzhong³, Zhang Zhongcheng¹

(1. College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. State key Laboratory for Agrobiotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

3. Tianjin Animal Husbandry & Veterinary Institute, Tianjin 300112, China)

Abstract To screen out an optimal protocol with low-cost and high-efficiency for superovulation and embryo transfer (ET) in the commercial application, 127 sheep of Dorset, Suffolk and Dorper breeds and 111 Boer goats were superovulated with different FSH made in different countries and the obtained embryos were transferred into 1231 Small Tail Han sheep and milk goats with different methods (surgically or by laparoscope) under production conditions. The results demonstrated that the mean number of viable embryos per Boer goat superovulated by FSH made in New Zealand ($n = 14$) was higher ($P < 0.05$) than that by FSH made in Australia ($n = 7.59$); the superovulatory response in Boer goats treated with FSH made in China Academy of Science (CAS) and FSH made in New Zealand was similar ($P > 0.05$); the mean numbers of viable embryos from sheep of different breeds superovulated by the same FSH or sheep of the same breed superovulated by different FSH (made by CAS or in New Zealand) showed no significant difference ($P > 0.05$); and no significant difference ($P > 0.05$) was observed in the pregnancy rates of embryos transferred surgically and by laparoscope (57.44% vs 60.20%). In conclusion, the combination of superovulation with FSH (made in CAS) and ET by laparoscope could be suitable for sheep and goat ET industrialization in terms of low cost and high efficiency.

Key words sheep; goat; superovulation; embryo transfer; pregnancy rate

收稿日期: 2005-02-18

基金项目: 科技部农业科技成果转化资金资助项目(03EFN211300026);北京市科委重点项目(H022020060420)

作者简介: 付静涛, 硕士研究生;朱士恩, 教授, 通讯作者, 主要从事胚胎生物技术研究, E-mail: zhushien@cau.edu.cn

胚胎移植是胚胎生物技术的重要组成部分,利用胚胎移植技术可使优秀种畜的基因高效地保留和遗传下去^[1]。澳大利亚、新西兰、加拿大和美国等已普遍在育种工作中采用超数排卵和胚胎移植技术相结合,取得了显著效果,其中新鲜胚胎和冷冻胚胎移植妊娠率分别达60%和50%以上。在国内,引进优良品种实施超数排卵处理和胚胎移植技术的研究与应用发展迅速,由过去的新疆细毛羊发展到国外引进绵羊品种如道塞特、萨福克、德克赛尔、杜泊和波尔山羊品种等;过去仅在内蒙古、新疆牧区实施,目前已全国各地示范推广。但是,开展羊胚胎移植及相关生物技术除了成本高外,移植妊娠率还不够理想,目前总体水平即新鲜胚胎移植妊娠率为50%,冷冻胚胎移植妊娠率也仅有45%,影响了该项技术在生产中推广及其产业化进程。妊娠涉及胚胎和母体子宫间妊娠信号的建立、附植的发生和胎盘的形等成一系列生理、生化过程^[2],并受胚胎质量、供受体同期化水平、受体的体况、黄体的质量、胚胎移植技术和胚胎体外操作等因素的影响。其中胚胎附植过程和附植机理的研究已成为胚胎生物技术领域的热点,具有很强的理论和生产实际意义。目前国内外普遍采用促卵泡素(FSH)对羊进行超数排卵处理。有研究证实,卵泡波发生与血浆FSH浓度周期性出现峰值有关;优势卵泡的选择过程与FSH浓度下降和卵泡与LH获得反应能力有关^[3]。本研究旨在深入探索并优化FSH对绵羊、山羊超数排卵方案,为生产中降低成本,提高效率提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供、受体羊的选择及饲养管理

1) 供体羊。供体母羊系由澳大利亚引进的道塞特、萨福克、杜泊3个品种绵羊和纯种波尔山羊,年龄1~4岁,健康,无繁殖疾病。供体母羊除按正常的饲养管理外,超数排卵处理前1个月补饲胡萝卜和富含维生素、矿物质等的全价配合饲料。

2) 受体羊。选择年龄2~5岁、健康、无繁殖疾病的小尾寒羊和奶山羊为受体羊。受体羊在同期发情处理前至少1个月进行补饲,使体况达到中等以上。

1.2 激素药品

FSH分别为新西兰(Immuno Chemical Products Ltd.)、加拿大(Vetrepharm Canada Inc.)、澳大利亚(Jurox Pty. Ltd. in Australia)和中国科学院生产。

孕酮阴道栓为新西兰(Pharmacia & Upjohn Pty. Ltd.)产CIDR(0.3 g/支)和澳大利亚(Intervet Pty. Ltd.)产海绵栓(0.5 g/支)。PMSG为天津实验动物中心生产。LH为宁波市激素制品有限公司产。孕酮(Progestin)为澳大利亚(Intervet Pty. Ltd.)产。PGF₂上海计划生育研究所产(0.2 mg/支)。

1.3 供体羊超数排卵

山羊:在发情周期的任意一天,阴道埋置第1个CIDR,第10天换第2个CIDR,第16~19天每日早晚分2次(间隔时间相等)等量注射FSH(总剂量分别为:新西兰产7.04 mg/只;加拿大产160 mg/只;澳大利亚产12 mL/只;中国科学院产4 mg/只),第7次注射FSH时,取出CIDR。取CIDR后第2天开始试情,发情供体羊进行第1次配种,之后间隔12 h进行第2、第3次配种。第1次配种后的第3天开始注射Progestin(2次/d),连续注射3 d。

绵羊:在发情周期的任意一天,阴道埋置CIDR,第11~14天每日早晚分2次(间隔时间相等)等量注射FSH(总剂量分别为:新西兰产8.80 mg/只;加拿大产200 mg/只;澳大利亚产12 mL/只;中国科学院产5 mg/只),第13天取出CIDR,并同时注射PGF₂ 0.06 mg,第15天开始试情,发情供体羊进行第1次配种并同时注射LH 100 IU。

1.4 受体羊同期发情

山羊:为奶山羊。在其发情周期的任意一天,阴道埋置孕酮海绵栓(澳大利亚 Intervet Pty. Ltd. 30 mg),第16天注射PMSG 160 IU,第18天取出海绵栓,观察并记录发情时间。

绵羊:为小尾寒羊。在其发情周期的任意一天,阴道埋置孕酮海绵栓(同山羊),第12天注射PMSG 280 IU并同时取出海绵栓,观察并记录发情时间。

1.5 胚胎的采集与移植

供体羊发情并配种后第7天,用手术法由子宫中冲取致密桑椹胚或囊胚,分别用常规手术法和腹腔镜法移植给与供体发情同步差为 ± 12 h的受体。腹腔镜法和常规手术法的胚胎移植为同一术者。

1.6 统计分析

采用²检验法。

2 结果

2.1 不同国别生产的FSH处理后波尔山羊供体的超排卵效果

使用不同国别生产的FSH对波尔山羊供体进

行超数排卵处理,结果表明(表1),新西兰产 FSH 的超排效果明显优于澳大利亚产 FSH,每只供体平均获得可用胚胎数(14.00 vs 7.59)有显著性差异($P < 0.05$),但中国科学院产 FSH 与新西兰产 FSH 两者超排效果无显著性差异($P > 0.05$)。

表1 不同国别生产的 FSH 处理后对波尔山羊超数排卵比较

Table 1 Comparison of superovulatory response in Boer goats treated with FSH (made in different countries)

FSH 产地	处理羊数/只	未受精卵数/只	退化胚数/只	回收胚数/只	可用胚数/只
澳大利亚	51	0.59(30/51)	0.24(12/51)	8.65(441/57) a	7.59(387/51) a
加拿大	16	2.25(36/16)	0.56(9/16)	13.19(211/16) b	9.44(151/16) ab
新西兰	20	0.50(10/20)	0.70(14/20)	15.30(306/20) bc	14.00(280/20) b
中国科学院	24	0.54(13/24)	0.42(10/24)	12.67(304/24) b	10.38(249/24) b

注:同一栏数值中不同字母表示差异显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);a,b: $P < 0.05$, a,c: $P < 0.01$ 。

2.2 中国科学院与新西兰产 FSH 处理后不同品种绵羊供体超数排卵比较

对道塞特、萨福克、杜泊 3 个品种绵羊供体分别用中国科学院和新西兰产 FSH 进行超数排卵处理,

结果见表 2。不同 FSH 对同品种绵羊的处理与不同品种绵羊用同种 FSH 处理结果,平均每只绵羊可用胚胎数无显著差异($P > 0.05$)。

表2 中国科学院产与新西兰产 FSH 处理后绵羊超数排卵比较

Table 2 Comparison of superovulatory response in sheep treated with FSH (made in CAS and New Zealand)

绵羊品种	FSH 产地	处理羊数/只	未受精卵数/只	退化胚数/只	回收胚数/只	可用胚数/只
道塞特	中国科学院	22	0.27(6/22)	0.27(6/22)	4.86(107/22) a	3.45(76/22) a
	新西兰	25	0.96(24/25)	0.12(3/25)	5.16(129/25) a	3.96(99/25) a
萨福克	中国科学院	22	0.59(13/22)	0.23(5/22)	4.36(96/22) a	3.27(72/22) a
	新西兰	27	0.19(5/27)	0.48(13/27)	5.26(142/27) a	4.44(120/27) a
杜泊	中国科学院	15	0.20(3/15)	0.13(2/15)	4.27(64/15) a	3.47(52/15) a
	新西兰	16	0.06(1/16)	0.06(1/16)	4.06(65/16) a	3.50(56/16) a

注:同一品种同一栏数值中具有相同字母表示无显著性差异($P > 0.05$);下同。

2.3 受体单侧卵巢黄体数量对移植妊娠率的影响

奶山羊、小尾寒羊绵羊受体单侧卵巢上有 1~3 个黄体的移植妊娠率(表 3)无显著性差异($P > 0.05$)。

表3 山羊、绵羊受体单侧卵巢黄体数量对移植妊娠率的影响

Table. 3 Effect of one, two or three corpus luteums in single ovary of recipients (goats and sheep) on pregnancy rates

品种	黄体数	移植受体总数	妊娠受体数	妊娠率/ %
奶山羊	1	373	217	58.18 a
	2	135	79	58.52 a
小尾寒羊	1	106	60	56.60 a
	2	87	49	56.32 a
	3	40	25	62.50 a

2.4 不同移植方法对绵羊受体移植妊娠率的影响

腹腔镜法和常规手术法移植对绵羊受体妊娠率比较实验结果表明,采用腹腔镜法和常规手术法移植的受体妊娠率(57.44% vs 60.20%)无显著性差异($P > 0.05$)(表 4)。

表4 腹腔镜法与常规手术法移植对绵羊受体妊娠率的影响

Table 4 Comparison of pregnancy rates of embryo transferred surgically or by laparoscope

移植方法	移植受体总数	妊娠受体数	妊娠率/ %
常规手术法	201	121	60.20 a
腹腔镜内窥镜法	289	166	57.44 a

3 结论与讨论

3.1 中国科学院生产的 FSH 可提高供体羊的胚胎生产效率、降低成本

本实验结果表明,使用新西兰、加拿大和澳大利亚生产的 FSH 对波尔山羊进行超数排卵处理,新西兰产 FSH 的效果最佳(可用胚平均 14 枚/只),澳大利亚产 FSH 的超数排卵效果最差(可用胚平均 7.59 枚/只),有显著性差异 ($P < 0.05$);而中国科学院产 FSH 超数排卵效果(可用胚平均 10.38 枚/只)与新西兰产 FSH 相比无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1)。说明不同国别生产的激素中 FSH 的含量以及 FSH 与 LH 的比例不同,导致超数排卵效果存在差异^[4]。分别使用中国科学院和新西兰产 FSH 对道塞特、萨福克、杜泊 3 个品种绵羊进行超数排卵,结果表明,供体羊平均获得可用胚胎数均无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 2)。说明同一厂家生产的 FSH 对供体羊超数排卵效果无品种间差异。这个结果与 Picazo 等^[5]的报道相似。同时实验也证实中国科学院产 FSH 可以代替进口 FSH 使用,并可大大降低成本。

3.2 卵巢黄体数量(1~3 个)不影响受体羊移植妊娠效果

外源 PMSG 作用可使多个卵泡发育而排卵,因此受体羊经同期发情处理后,胚胎移植时卵巢上有 1 个乃至几个黄体。胚胎移植结果表明,无论是山羊或绵羊受体,单侧卵巢上含有 1、2 或 3 个黄体的胚胎移植妊娠率均无显著差异 ($P > 0.05$) (表 3)。说明卵巢上黄体数量的多少(1~3 个)并不与其移植受体的妊娠率高低存在必然联系,而是取决于黄体的质量。Ravindra 等^[6]和 Evans 等^[7]分别对绵羊、山羊卵泡发育规律的研究,也证明了卵巢中黄体发育的质量直接关系到妊娠率的高低。本实验结果受体单侧卵巢上含有 3 个黄体的移植妊娠率(62.5%)高于 1 个(56.6%)和 2 个黄体(56.32%),这与田树军等^[8]所报道结果相似,可能是随着黄体数量的增加,孕酮总体水平升高,有利于胚胎在子宫中的附植,此结果还有待于更多的实验数据证实。

3.3 腹腔内窥镜移植法在羊胚胎移植产业化中有推广价值

本实验结果显示,采用腹腔内窥镜法和常规手术法的胚胎移植妊娠率分别为 57.44% 和 60.20%,

无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 4),且腹腔内窥镜法大大缩短了操作时间。常规手术法胚胎移植需 15 min/只,采用腹腔内窥镜法缩短到 2 min/只。采用常规手术法胚胎移植,需要将子宫、输卵管和卵巢完全暴露于体外,在牵拉卵巢和子宫过程中易发生出血,导致术后卵巢或子宫与腹腔黏膜发生粘连;且由于手术创口较大容易造成疝的发生。陈传友(2003)也证明了采用腹腔内窥镜法移植,可借助电光源观察黄体发育程度,再用肠钳轻取有黄体侧的子宫角部分并暴露于体外,手术创口小、出血少,较常规手术法移植可显著降低术后粘连^[9]。为此,本实验得出的结论是腹腔内窥镜法在羊胚胎移植产业化中值得推广。

参 考 文 献

- [1] John F Hasler. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle [J]. *Animal Reproduction Science*, 2003, 79:245-264
- [2] Cross J C, Werb Z, Fisher S J. Implantation and the placenta key pieces of the development puzzle [J]. *Science*, 1994, 266(5190):1508-1518
- [3] Adams G P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants [J]. *J Reprod and Fertil Suppl*, 1999, 54:17-32
- [4] Bari F, Khalid M, Wolf B, et al. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep [J]. *Theriogenology*, 2001, 56(1):147-155
- [5] Picazo R A, Cocero M L, Barragán, et al. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep [J]. *Theriogenology*, 1996, 45(5):1065-1073
- [6] Ravindra J P, Rawlings N C, Evans A C, et al. Ultrasonography study of ovarian follicular dynamics in ewes during the oestrous cycle [J]. *J Reprod and Fertil*, 1994, 101(2):501-509
- [7] Evans A C, Duffy P, Hynes N, et al. Waves follicle development during the estrous cycle in sheep [J]. *Theriogenology*, 2000, 53(3):699-715
- [8] 田树军,桑润滋,李铁栓,等. 提高波尔山羊超排效果及移植妊娠率研究初报[J]. *畜牧与兽医*, 2004, 36(2):27-28
- [9] 陈传友. 浅谈腹腔镜在羊胚胎移植中的应用[J]. *黑龙江动物繁殖*, 2003, 11(4):25