

奶山羊冻胚长期保存长途运输和移植试验*

王光亚 马保华 段恩奎 王建辰

(西北农业大学动物医学系, 陕西杨陵·712100)

摘要 用RPE简易冷冻器快速冷冻6~7日龄萨能奶山羊胚胎。将在液氮中冻存12~819 d的胚胎用液氮罐经汽车或火车运至外地,并把解冻后的73枚胚胎移植给38只当地山羊。受体妊娠率为60.5%,移植胚产羔率为39.7%。胚胎冻存12~21,198~265,320~480和687~819 d时,移植产羔率分别为38.5%,45.8%,41.7%和25.0%。各冻存期间差异不显著($P>0.05$)。

关键词 冷冻胚胎,长期保存,长途运输,山羊

中图分类号 S827.940.36, S814.6

山羊冻胚移植最早于1976年由Bilton研究成功^[1]。笔者于1987年首获国内山羊冻胚移植成功^[2],随后对冷冻方法进行了改进,获简易快速冷冻成功^[3],并系统研究了胚胎回收和移植技术^[4]。近几年家畜冻胚移植也有不少成功的报道,但大多限于实验室条件下进行研究。关于山羊冻胚的长期保存和长途运输也未见正式报道。本试验旨在将冻胚运至不同距离,并在生产条件下解冻移植,以检验不同冻存期胚胎的移植产羔情况,使奶山羊冻胚移植的实验技术尽快转化为生产技术。

1 材料和方法

供试动物 选15只优秀西农萨能奶山羊,用FSH超排作为供体。38只受体为湖南长沙的浏阳黑山羊和陕西泾阳、蓝田、杨陵的杂种奶山羊。

胚胎回收和冷冻保存 手术法回收6~7日龄胚胎,以含10%甘油的20%血清PBS作保护剂,用RPE简易冷冻器快速冷冻后投入液氮长期保存,每隔2~3个月检查一次液氮罐,必要时补充液氮。

胚胎运输 省内运输是直接把保存胚胎的30L液氮罐用汽车运至现场。省外运输是把冻胚细管移到3L液氮罐中随身携带乘火车运输,由于液氮罐容量小及路途震动,液氮消耗大,必须在2~3d内到达目的地,并在到达后立即补充液氮或将细管移入大罐中。

胚胎解冻和移植 在各移植地点解冻胚胎,并以手术法移植于自然发情或用孕激素阴道栓诱导发情后6~7d的受体羊黄体侧子宫角尖端。

资料分析 对所获结果,用率的差异显著性检验进行统计分析。

2 结果

2.1 冻胚移植时间、地点与产羔情况

1989年10月至1992年1月,在省内外四个不同地点共移植受体38只(见附表)。不同时

收稿日期:1994-01-04.

* 杨陵科技开发基金资助项目。

间和地点的妊娠产羔结果无显著差异($P>0.05$)。

附表 奶山羊冻胚在不同时间和地点的移植产羔结果

时 间	地 点	受体数	妊娠数(%)	流产数(%)	产羔数
1989.10.8~11.6	泾阳	6	4(66.7)	1(25.0) ²⁾	5(♂2,♀3)
1990.7.4~7.22	长沙	6	3(50.0)		5(♂3,♀2)
1991.5.6~6.7	长沙	5	2(40.0)	1(50.0) ²⁾	2(♂2)
1991.9.11~9.15	蓝田	15	9(60.0) ¹⁾		14(♂8,♀6)
1992.1.9~1.19	杨陵	6	5(83.3)	3(60.0) ³⁾	3(♂2,♀1)
合 计		38	23(60.5)	5(21.7)	29(♂17,♀12)

注:1)1只受体妊娠60d死亡,胎儿长约20cm;2)畜主见到流产,但未注意胎儿数;3)妊娠60~90d,隐性流产。

2.2 不同冻存期胚胎的移植结果

冻存12~21,198~265,320~480和687~819d的胚胎,移植后的产羔率分别为38.5%(5/13),45.8%(11/24),41.7%(10/24)和25.0%(3/12)。不同冻存期之间无显著差异($P>0.05$)。

2.3 不同胚龄及透明带破损胚的移植结果

73枚冻胚中桑椹胚4枚,囊胚49枚,扩张囊胚和孵出胚共6枚,解冻后透明带有不同程度破损的桑椹胚和囊胚14枚,移植后产羔率分别为50%,44.9%,16.6%和42.9%,除扩张囊胚和孵出胚较低外,其他胚胎之间无显著差异($P>0.05$)。

2.4 不同供体的胚胎解冻移植结果

解冻移植的73枚胚胎来自15只供体,不同供体的冻胚移植结果差异很大,其中7只的20枚胚胎(每只1~6枚)移植后全未产羔,2只供体的3枚胚胎移植后全部产羔,其余6只的胚胎移植产羔率分别为20%(2/10),33.3%(1/3),40.0%(4/10),66.7%(2/3),66.7%(10/15)和77.8%(7/9)。

2.5 不同移植数量和受体黄体数与产羔结果

移植1,2,3枚胚胎的受体分别有5,31,2只,总受胎率为60.5%(23/38)。卵巢上有1个黄体而移双胚的受体,双羔率为60.0%(3/5);有2个以上黄体而移双胚或三胚的受体,双羔或三羔率为88.9%(8/9)($p<0.05$)。

3 讨 论

胚胎冷冻技术的关键可能在于冷冻和解冻过程,但胚胎在超低温下能保存多久,是否能无限期保存,目前尚缺乏直接依据。我们的试验最长保存期为819d,结果表明不同冻存期的胚胎移植结果无显著差异,冻存819d的胚胎移植后仍能正常产羔。移植结果还表明,不同供体的胚胎、不同胚龄、受体状态及外界因素对移植结果有明显影响。

不同供体羊的冻胚移植产羔率有明显差异,说明胚胎来源及内在质量可能是影响移植结果的主要因素之一。冷冻保存的桑椹胚和囊胚,解冻后移植产羔率较高,甚至透明带破损而内细胞团完整的桑胚和囊胚,移植产羔率也未受显著影响。说明这一发育阶段的胚胎,透明带的作用已不如更早期胚胎那么重要。但扩张囊胚和孵出胚的移植结果较差,可能是这两个阶段的胚胎不完全适于本试验采用的冷冻或解冻方法。诱导发情羊一般卵巢上黄体数较多,但部分羊同时有大卵泡存在,可能与诱导发情时生殖激素分泌范型和水平

改变有关,因而妊娠率低于自然发情羊(50%对70%)。但诱导发情羊移植双胚时,一旦妊娠,则双羔率较高(88.9%对60.0%)。因此,移植胚胎的总产羔率高于自然发情的羊。受体所处的自然环境对妊娠产羔结果也有一定影响,如1991年在长沙移植的受体及1992年在杨陵移植的受体因传染性口膜炎严重影响采食,致使妊娠受体发生隐性流产;蓝田县移植的受体因病死亡1只而致胎儿死亡。

本试验受体总妊娠率达60.5%,已达到了 Bessoudo 等^[5]对安哥拉山羊大规模鲜胚移植的妊娠率(57.8%)的水平。说明山羊冻胚移植技术已基本成熟为生产技术。关于更长期的冻胚保存则有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Bilton RJ, Moore NW. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. *Austr J Biol Sci*, 1976, 29: 125~129
- 2 Wang Y R, Ma BH, Wang JC. Embryo freezing and transfer in milk goats. *Theriogenology*, 1988, 29(1): 322
- 3 芮荣,王建辰,王光亚. 山羊胚胎简易冷冻试验. *畜牧兽医学报*, 1990, 21(2): 127~131
- 4 王光亚,马保华,王建辰. 农业生物技术. 西安: 陕西科学技术出版社, 1990: 230~235
- 5 Bessoudo E, Davies L, Coonrod S. Commerical embryo transfer in Australian Angora Goats. *Theriogenology*, 1988, 29(1): 222

Long-term Cryopreservation, Long-distance Transportation and Transfer of Dairy Goat Embryos

Wang Guangya Ma Baohua Duan Enkui Wang Jianchen

(Department of Veterinary Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract Embryos from superovulated Saanen dairy goats on days 6-7 (mating day=day 0) were quickly frozen in a simple RPE freezer. After being frozen for 12~819 days, a part of embryos was transported by car or train to other places of the country using a jar with LN₂. After thawing, 73 embryos were transferred into 38 recipients of indigenous goats. Pregnant rate of recipients was 60.5% (23/28). Kidding rate of the transferred embryos was 39.7% (29/73). After being frozen for 12~21, 198~125, 320~480 and 687~819 days, no significant difference ($P>0.05$) was found in kidding rates of transferred embryos which had been frozen for different duration.

Key Words frozen embryos, long-term cryopreservation, long-distance transportation, goat