

小型农牧场及农户波尔山羊胚胎移植关键技术研究^{*}

马保华,田秀娥,李 明,王志东,陈玉林,王永军

(西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 从小型农牧场及农户特点出发,探讨在这些场(户)进行波尔山羊胚胎移植时,供体超数排卵、受体同期发情、供受体羊胚胎回收和移植操作等关键技术对胚胎移植效率的影响。结果表明,调整供、受体母羊的发情周期并采用优化超排程序和同期发情程序,可获得理想的超排和同期发情结果,有效手术供体回收卵数平均达到 (17.31 ± 6.93) 枚,可用胚 (14.96 ± 6.28) 枚;受体同期发情率达到94.28% $(2\ 125/2\ 254)$,手术受体利用率为86.55% $(1\ 602/1\ 851)$ 。严格而熟练的手术操作可提高供体利用次数,获得理想的胚胎移植结果,将2 648枚胚胎移植给1 602只受体后,妊娠率达到66.85% $(1\ 071/1\ 602)$,其中1 044只受体妊娠足月,产羔1 320只。

[关键词] 胚胎移植;饲养管理;超数排卵;同期发情;波尔山羊

[中图分类号] S827.3⁺6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)12-0079-05

波尔山羊胚胎移植是国内近几年发展速度较快、规模较大的家畜胚胎移植技术,国内许多单位都相继开展了波尔山羊胚胎移植研究与推广工作^[15]。但我国并不提倡小型农场及农户从事波尔山羊胚胎移植工作,因此国家及地方政府资助的有关胚胎工程产业化研究与示范项目一般不包含这部分研究工作。现实情况下,小型农场及农户从事波尔山羊胚胎移植是我国胚胎工程实用化的重要组成部分,在一定程度上促进了我国肉用山羊品种改良工作的进行。作者从2001年秋到2004年春,在陕西、山西、河南、甘肃等省的16个小型农牧场和农户中进行了波尔山羊胚胎移植工作,针对这些场(户)胚胎移植工作的特点,对供受体饲养管理、供体超数排卵、受体同期发情、供受体羊胚胎回收和移植手术等关键技术问题进行了研究,以期小型农牧场及农户的波尔山羊胚胎移植实用化工作提供指导,使胚胎移植技术在优秀肉用山羊的快速扩繁、品种改良中发挥更大的作用。

1 材料与方法

1.1 供、受体母羊与供体配种公羊

供体母羊为16个小型农牧场和农户养殖的波尔山羊纯种母羊,年龄16岁,临床健康。受体羊包

括关中奶山羊、波杂F₁代母羊、本地杂种奶山羊及胚胎移植实施地区本地山羊,1~5岁,临床健康。供、受体比例为1:101:12。配种公羊为场(户)养殖或临时租借的优秀种公羊,年龄1.54岁。

1.2 药品与试剂

促卵泡素(follicle stimulating hormone, FSH),供体使用中科院动物研究所(北京,10 mg/支)及Bioniche Animal Health Canada Inc.(加拿大)产品,受体使用宁波第二激素厂产品,100 u/支;促排卵素3号(luteinizing hormone releasing hormone A₃, LRH-A₃)由宁波第二激素厂生产,20 μg/支;氯前列烯醇(estrumate)由上海市计划生育科学研究所生产,0.2 mg/支;羊实用型炔诺酮阴道栓为本课题组试制,每枚含炔诺酮60 mg;胚胎回收液(冲卵液)为自行配制的含体积分数2%~5%灭活新生犊牛血清(NCS)的磷酸盐缓冲液(PBS),或采用进口冲卵液(embryo flushing solution);胚胎保存液为含体积分数15% NCS的PBS或进口保存液(embryo holding solution);速眠新注射液由军需大学兽医研究所生产,1.5 mL/支;苏醒灵注射液由军需大学兽医研究所生产,2.0 mL/支。

1.3 主要器械与设备

鼓风干燥箱,高压蒸汽灭菌器,腹腔镜,体视显

^{*} [收稿日期] 2004-05-20

[基金项目] 陕西省科学技术研究发展计划项目(农业攻关)(2002 K01- C5-4)

[作者简介] 马保华(1965-),男,陕西城固人,副教授,博士,主要从事动物胚胎工程研究。

显微镜,恒温水浴锅,手术器械,自制手术保定台,自制专用胚胎回收及移植器械。

1.4 供体超数排卵处理与配种

每只供体注射氯前列烯醇 0.2 mg(程序 0 d);第 7~8 天阴道放置羊实用型炔诺酮阴道栓;第 16~17 天上午开始,以剂量递减法注射 FSH,每 12 h 1 次,共 7 次,FSH 总量为 270 或 300 mg(加拿大),抑或 10 mg(北京);第 6 次注射 FSH 的同时撤除阴道栓;第 6,7 次注射 FSH 的同时各注射氯前列烯醇 0.1 mg;若第 7 次注射 FSH 前母羊发情,不再继续注射,未发情者继续完成注射程序,并注意观察发情情况。发情开始后 8 h 首次配种或人工授精,并注射 LRH-A₃ 10 μg/只,以后每隔 8 h 复配或人工授精 1 次,直至发情结束。

1.5 受体同期发情处理及试情

程序 1:阴道放置羊实用型炔诺酮阴道栓(0 d);撤栓前 12 h 各注射 FSH 25 U,第 11~12 天上午撤栓,撤栓同时注射 FSH 25 U,氯前列烯醇 0.1 mg。程序 2:注射氯前列烯醇 0.1 mg(程序 0 d),7~8 d 放置羊实用型炔诺酮阴道栓,撤栓前 24 和 12 h 各注射 FSH 25 U,18~19 d 上午撤栓,同时注射氯前列烯醇 0.1 mg。具体注射及撤栓日期根据供体超排程序安排,使受体撤栓时间早于供体 12 h。撤栓后 12 h 开始,每 12 h 试情 1 次,96 h 内发情者视为同期发情处理有效。

1.6 胚胎回收与质量鉴定

供体配种后 3 d(根据发情持续期和配种结束时间确定上、下午),放置配种后炔诺酮阴道栓。发情、配种结束后 5~6 d 为手术时间。手术羊饥饿 36 h,手术前腹腔镜检查卵巢反应^[6],确定能否进行胚胎回收。对黄体退化或超排反应较差(双侧卵巢排卵

数量合计少于等于 4 枚)者不进行胚胎回收。超排有效供体术部剃毛,麻醉、保定、消毒,进行子宫角胚胎回收^[7]。回收液体静置 2~5 min 后,将集卵杯置体视显微镜下(15 ×~20 ×)捡卵,并用新鲜的保存液净化胚胎 3 次,在镜下(60 ×~80 ×)对胚胎进行形态质量分级,A,B 级定为可用胚,置保存液中待移植。其中 A 级为优质胚胎,胚胎发育阶段与胚龄一致,卵裂球大小、颜色、结构一致。B 级胚胎发育阶段与胚龄基本一致,大部分卵裂球大小、颜色、结构一致,少数卵裂球与细胞团联系不紧密。

1.7 胚胎移植及移植结果判定

以与供体发情同步差 0~24 h 的受体羊为候选移植受体。手术前饥饿 24~36 h,手术时确认卵巢上存在正常发育黄体者为可移植受体,进行子宫角胚胎移植^[7]。根据胚胎数量、受体黄体数量和质量确定移植胚胎数量(1~3 枚)。在受体移植胚胎后的 40~60 d 用 B 超进行孕检,确定怀孕结果,产羔后统计妊娠到期受体和产羔数。

2 结果与分析

2.1 供体超排及胚胎回收结果

由表 1 可见,试验中共超排波尔山羊 213 只,对超排有效的 185 只供体进行胚胎回收,有效手术 177 只,因供体羊自身原因导致的无效手术 8 只。无效手术羊中,1 只在 2 年前因难产助产引起子宫脱落,一直未产,超排后卵巢上黄体 36 枚,回收卵数为 0;1 只在春季进行剖腹产,卵巢上黄体 21 枚,回收 14 枚卵母细胞;6 只由外省购回或上年度由其他胚胎移植人员进行过手术,因子宫角严重粘连,无法拉出切口回收胚胎。有效手术供体胚胎回收结果见表 2。

表 1 波尔山羊供体超排处理结果

Table 1 The result of superovulation treatment of the donor in Boer goat

FSH 来源 FSH producer	FSH 剂量/ mg FSH dose	供体羊分类 Group of donor	超排数 Number of donor	超排发情供体数 Estrous donor			
				总数 (比例/ %) Total number	超排有效供体 (比例/ %) Number of donor with available superovulation	超排反应不良供体 (比例/ %) Number of donor with poor superovr lation result	黄体退化供体 (比例/ %) Number of donor with degenerating corpus luteum
北京 Beijing , China	10	经产羊 Multiparous goat	80	79(98.8)	68(86.1)	4(5.1)	7(8.9)
		青年羊 Young goat	6	6(100)	3(50.0)	0(0)	3(50.0)
加拿大 Canada	270	经产羊 Multiparous goat	52	52(100)	48(92.3)	0(0)	4(7.7)
		青年羊 Young goat	10	10(100)	9(90.0)	0(0)	1(10)
	300	经产羊 Multiparous goat	43	42(97.7)	41(97.6)	0(0)	1(2.4)
		青年羊 Young goat	19	19(100)	16(84.2)	0(0)	3(15.8)
合计 Total			213	208(97.7)	185(88.9)	4(1.92)	19(9.1)

表 2 供体胚胎回收结果

Table 2 The result of superovulation on donor

FSH 来源 FSH producer	FSH 剂量/ mg FSH dose	供体羊分类 Group of donor	胚胎回收手术次数 Times of operation for embryo collection	超排有效供体数 Number of donor with available superovulation	有效手术供体数 Number of donor with available operation	胚胎回收数 ($\bar{x} \pm Sd$) Total number of collected embryo	可用胚胎数 ($\bar{x} \pm Sd$) Number of usable embryo
北京 Beijing , China	10	经产羊 Multiparous goat	1	48	46	912(19.83 $\pm$ 8.44)	805(17.50 $\pm$ 8.58)
			2	20	18	249(13.83 $\pm$ 8.76)	206(11.44 $\pm$ 8.32)
		青年羊 Young goat	3	3	3	33(11.00 $\pm$ 7.93)	33(11.00 $\pm$ 7.93)
加拿大 Canada	270	经产羊 Multiparous goat	1	38	38	678(17.84 $\pm$ 6.86)	614(16.16 $\pm$ 7.23)
			2	10	7	147(21.00 $\pm$ 9.87)	118(16.86 $\pm$ 8.75)
		青年羊 Young goat	3	9	9	126(14.00 $\pm$ 8.24)	98(10.89 $\pm$ 8.89)
	300	经产羊 Multiparous goat	1	17	17	337(19.82 $\pm$ 7.98)	268(15.76 $\pm$ 8.36)
			2	16	15	256(17.07 $\pm$ 7.55)	207(13.8 $\pm$ 6.82)
			3	8	8	91(11.38 $\pm$ 8.82)	87(10.88 $\pm$ 9.47)
	青年羊 Young goat	1	14	14	193(13.79 $\pm$ 8.99)	177(12.64 $\pm$ 8.81)	
		2	2	2	41(20.5 $\pm$ 6.36)	35(17.50 $\pm$ 4.95)	
合计 Total				185	177	3 063(17.31 $\pm$ 6.93)	2 648(14.96 $\pm$ 6.28)

2.2 受体同期发情及胚胎移植结果

对 2 254 只受体群母羊进行同期发情处理的结果表明,同期发情的有 2 125 只(94.28%),根据胚胎数量、质量及各批次同期发情受体情况,对 1 851 只候选移植受体进行手术,确认可移植的受体为 1 602 只,不能进行胚胎移植的受体为 249 只。不

能进行胚胎移植的受体中,67 只卵巢上黄体与大卵泡共存,104 只卵巢上既无黄体也没有卵泡,39 只黄体过早退化,23 只已做过胚胎移植手术,子宫角粘连严重,16 只患子宫或输卵管疾病。受体同期发情处理及手术受体利用率见表 3。

表 3 受体羊同期发情结果及手术受体利用率

Table 3 Results of treatment for synchronized estrous and the usable ratio of the operated recipient

处理程序 Method	处理数 Number of treatment for synchronized estrous	同期发情只数(比例/ %) Number of the estrous synchronization recipient	手术受体数 Number of the operated recipient	可移植受体/(比例/ %) Number of the usable recipient
程序 1 Method 1	1 031	947(91.85)	819	678(82.78)
程序 2 Method 2	1 223	1 178(96.32)	1 032	924(89.53)
合计 Total	2 254	2 125(94.28)	1 851	1 602(86.55)

1 602 只可移植受体共移植胚胎 2 648 枚,妊娠期流产(后期较多),1 044 只受体妊娠足月,产羔 1 071 只,妊娠率 66.85%,其中 27 只在妊娠的不同时期流产。受体胚胎移植结果见表 4。

表 4 受体胚胎移植结果

Table 4 The result on embryo transferring of recipients

每只受体 移植胚胎数 Number of transferred embryo per recipient	移植受体数 Number of the transferring recipient	移植胚胎数 Number of transferred embryo	妊娠受体数 (比例/ %) Number of the gravidity recipient	产羔受体数 Number of the kidding recipient	产羔数 Number of kids	胚胎成活率/ % Survival ratio of the transferring embryo
1	662	662	414(62.73)	402	402	60.73
2	834	1 668	588(70.50)	577	793	47.54
3	106	318	69(65.09)	65	105	39.31
合计 Total	1 602	2 648	1 071(66.85)	1 044	1 320	49.85

3 讨 论

3.1 供体超数排卵与受体同期发情处理

小型农牧场及农户胚胎移植工作中,存在羊只

数量或质量的问题。所以,应针对现有羊群,尤其是供体羊,预先使用氯前列烯醇 1~2 次,以调整其发情周期,使大部分羊的周期基本同步,然后选择有利的发情周期阶段,采用经研究获得的优化超排程序

进行超排处理^[8]。

表 1 表明,用不同来源及不同剂量的 FSH 处理,经产羊和青年羊超排反应良好,但青年羊黄体退化率高,不同剂量对超排效果的影响无明显差异。表 2 表明,用不同来源及不同剂量的 FSH 处理,经产母羊首次回收卵和可用胚平均数分别达到 19.08 (1 927/101) 和 16.70 枚 (1 687/101),二次回收可分别达到 16.3 (652/40) 和 13.28 枚 (531/40),三次回收可分别达到 11.38 (91/8) 和 10.88 枚 (87/8);青年羊首次回收可分别达到 13.54 (352/26) 和 11.85 枚 (308/26),2 只超排效果较好的青年羊首次手术后 3 个月二次回收分别达到 20.5 (41/2) 和 17.5 枚 (35/2)。这一结果表明,采用调整供体羊发情周期的措施和优化超排程序的方法,能够获得理想的超排效果。选择质量稳定的国产及进口超排激素,均能获得较好的超排结果。超排中加拿大 FSH 的 2 种剂量,并非专门设计的剂量对比,只是在不同场(户)进行工作时,为了不浪费激素,而根据规模大小及包装剂量以大体上能用尽已开启包装的原则安排剂量。从结果上看,2 个剂量之间各类供体超排结果差异不大。

对于受体羊群,大多场(户)为了节约饲养成本而在胚胎移植前短期内集中购买,由于这时可能已进入当地地方品种羊的繁殖季节,购回羊只有怀孕的可能,而且部分羊只可能存在子宫炎症等疾病。因此,对新购回的受体羊注射氯前列烯醇,使怀孕羊流产,待羊只恢复 45 d 天以上时可以作为受体进行同期发情处理使用;氯前列烯醇的促子宫收缩作用,可帮助清除子宫炎性产物或其他异物,从而起到清宫作用。表 3 表明,采用的 2 种处理程序都能有效地诱导受体羊同期发情,其中程序 2 的同期发情效率较高,而且手术羊利用率也明显提高,说明在同期发情处理程序中再次使用氯前列烯醇,能很好地调整受体羊发情周期。

将解除快诺酮控制和配合使用促性腺激素安排在有利的发情周期进行,加之对促性腺激素使用时间的改进,能明显提高受体羊群的利用效率,可以在很大程度上减少受体购买和饲养数量,从受体利用方面提高了胚胎移植效益。由不能进行胚胎移植的发情受体组成看,卵巢无反应羊多为体格发育不符合要求的未经产青年羊,其部分受体卵巢上形成黄体的同时,仍存在发育中的大卵泡,因而仍需要对受体羊促性腺激素的使用时机和剂量做进一步探索。

3.2 胚胎回收和移植手术操作对移植效率的影响

在胚胎回收和移植操作中,应坚持严格按照手术操作规程进行手术,并对供体羊子宫角采取特殊的操作方法,尽力减少粘连的发生和粘连程度,提高重复利用率,因为重复利用次数一定程度上是决定小型农牧场及农户胚胎移植经济效益的关键因素。从研究结果看,由本课题组进行手术的供体重复使用时,未出现因粘连导致的无效手术,但由其他术者进行过胚胎回收的供体羊,有一部分子宫角严重粘连,甚至生殖系统与其周围内脏组织严重粘连,导致无效手术或胚胎回收率明显降低。

在所使用的受体羊中,部分羊只购入时已做过胚胎移植手术,卵巢上虽有黄体,但子宫角粘连严重而未能进行移植。说明受体羊胚胎移植时严格手术操作,也同样有益于提高其重复利用率。

3.3 受体胚胎移植数量对胚胎移植效率的影响

表 4 表明,移植 2 枚胚胎的受体妊娠率高于 1 枚和 3 枚胚胎,这种妊娠率的高低基本符合胚胎移植数量、质量与妊娠率关系规律。在实际中,一般在受体比较充裕时选择质量较好的胚胎进行单胚移植,虽然其妊娠率相对较低,但从妊娠率水平看,已经相当满意,而且最终胚胎成羔率较高。在胚胎数量较多而受体数量相对较少的情况下,一般安排移植 2 枚质量较好的胚胎,或 A、B 级搭配移植,即能够获得较高的妊娠率,虽然胚胎成羔率较移植 1 枚胚胎时低,但在一定程度上节省了受体购买及饲养数量。在胚胎数量较多而受体数量较少时,一般是先尽量选择质量较好的 2 枚胚胎进行双胚移植,所余胚胎按照 A、B 级搭配进行移植,而且多数应为 1A+2B 移植,部分按照 2A+1B 移植。由于胚胎数量多,受体的发情同步化选择余地相对变小,所以其妊娠率相对降低;而且由于 B 级胚胎发育率较低、发生妊娠期流产时损失数量较大以及生殖器官空间等原因,最终胚胎成羔率也就最低。说明实践中每只受体移植 1 枚 A 级胚胎或 A、B 级搭配 2 枚胚胎移植较为合理。

3.4 小型农牧场及农户胚胎移植过程存在的问题及解决方案

根据不同地方实地观察可以发现,小型农牧场及农户进行胚胎移植时,受饲养规模及经济能力的制约,普遍存在着急功近利、且不愿在羊群组成及饲养管理上进行合理投资的现象。所以,从数量和质量上讲,供体羊和受体羊的选择余地不大,并且存在以下问题:(1)出于成本考虑或对胚胎移植羊只的要

求不太了解,而临时购入了淘汰羊或已经做过胚胎移植手术的羊只;(2)羊群年龄层次不一,存在部分体格未完全发育成熟的青年羊及年龄较大的成年羊;(3)部分羊只发情周期不正常,或进入繁殖季节而不表现发情;(4)羊群整体体况较差,或只注重价值较高的供体羊的饲养管理而忽视了受体羊的饲养管理等。

根据以上试验结果,对小型农牧场及农户来说,胚胎移植工作中除应重视供体母羊的繁殖状况之外,其营养状况也在很大程度上影响着超排效果和胚胎质量,移植的胚胎要在受体体内发育为胎儿,受体必须能够保证胎儿发育的营养需要,所以受体母

羊的营养状况也是胚胎移植效果的重要影响因素。与大型农牧场相比,在小型农牧场及农户中,大多没有规范的羊群饲养管理制度,往往导致羊群体况达不到要求,或出现供体营养过剩而受体体况较差的情况。所以,应提前了解羊群体况,根据饲养管理条件,并结合当地饲草、饲料来源,提出切实可行、经济有效的饲养管理措施,如草料搭配比例、供应量及饲养管理日程和制度等。此外,还应特别强调对配种公羊的重视,从饲养、管理、配种训练和精液品质检查等方面都做出具体安排,特别是应加强向外租借公羊的精液品质检查。

[参考文献]

- [1] 桑润滋,田树军,李铁栓,等.影响波尔山羊超排效果因素的研究[J].草食家畜,2003,(增刊):83-87.
- [2] 高志敏,雷安民,窦忠英,等.波尔山羊胚胎移植技术的研究与应用[J].农业生物技术学报,2001,9(2):167-170.
- [3] 洪琼花,邵庆勇,廖德芳,等.波尔山羊胚胎移植技术的研究与应用[J].中国兽医学报,2002,22(4):354-355.
- [4] 李键,张红,马保华,等.波尔山羊胚胎移植奶山羊应用技术研究[J].西南农业学报,2002,15(3):94-97.
- [5] 田树军,桑润滋,肖庆利,等.应用胚胎移植技术快速扩繁波尔山羊试验[J].中国草食动物,2004,(8):10-12.
- [6] 王光亚,马保华.腹腔镜技术在山羊胚胎移植中的应用[J].西北农业大学学报,1987,15(4):73-78.
- [7] 朱庆麟,王建辰,梅福生,等.农业生物技术[M].西安:陕西科学技术出版社,1990.230-235.
- [8] 李键,张红,马保华,等.波尔山羊超数排卵的研究[J].西南农业学报,2002,15(4):92-95.

Study on the key techniques for Boer goat embryo transfer in miniature farms and households

MA Bao-hua, TIAN Xiue, LI Ming, WANG Zhi-dong, CHEN Yu-lin, WANG Yong-jun

(College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: According to the characteristics of miniature farms, the effects of the key technique processes such as the superovulation of the donors, synchronized estrum of the recipients and the operation of the embryo collection and transfer on the Boer Goat embryo transfer efficiency were discussed systematically. The results showed that having adjusted estrum period of the donors and the recipients, combined with adopted optimal superovulation program and synchronized estrous program, ideal result of superovulation and synchronized estrum can be obtained. The average number of ovum per available operation donor was (17.31 ± 6.93) , and the usable embryos were (14.96 ± 6.28) . The synchronized estrum ratio of the recipients was 94.28 % (2 125/2 254), the using ratio of the operated recipients was 86.55 % (1 602/1 851). The strict and proficient operation for embryo collection and transfer can improve the using time of the donors and obtain ideal embryo transfer result, after 2 648 embryos were transferred to 1 602 recipients, the pregnant ratio of the recipients was 66.85 % (1 071/1 602), 1 044 pregnant recipients to term and 1 320 kids were born.

Key words: embryo transfer; breeding and management; superovulation; synchronized estrum; Boer goat