

牛胚胎移植技术研究报告

金正泰 朴庆林 张学奎 贺淑杰 王晓阳 胡成华

(吉林省农科院畜牧分院)

摘 要

1985~1989年间超排222头供体奶牛,获卵1740枚($\bar{X}=7.8$),获可用胚1173枚($\bar{X}=5.3$)。其中1988~1989年超排100头,获卵923枚($\bar{X}=9.2$),获可用胚650枚($\bar{X}=6.5$),1989年全部用国产激素超排23头,获卵327枚($\bar{X}=14.2$),获可用胚242枚($\bar{X}=10.5$)。共移植于612头受体黄牛,受胎率47.1%(288/612)。其中6个试验点移植171头,受胎率为59.1%(101/171)。

胚胎移植技术是一项加速提高牛群生产性能、扩大良种牛群、缩短育种进程的最有效的繁殖手段。

此项技术可用于以黄牛为受体直接生产奶牛或肉牛。肉牛双胞胎、品种资源保存及引进等各个领域。至70年代末在北美和欧州各国,已广泛应用于生产并成为商业性贸易。目前,国外一次超排可获可用胚5~6枚,鲜胚受胎率达50~60%^[1]。国内据1988年全国16个单位统计,一次超排获可用胚4.4枚,鲜胚受胎率为36.5%^[2]。

本项研究试图结合我国实际,以奶牛为供体,以农村本地黄牛为受体,发展奶牛事业并探索不仅适合我国生产条件,而且成功率较高的技术方法,便于推广应用。

材料与 方法

(一)试验材料

1. 供受体牛:以黑白花奶牛为供体,以农户本地黄牛为受体。
2. 药品:前列腺素,上海产15甲基PGF_{2α}和进口lutalyse;促卵泡素,宁波和进口FSH-P;PBS为英国产粉剂。

(二)试验方法

1. 同步发情:每头牛肌注PG一次或两次。剂量为15甲基PGF_{2α} 2.4~3.6mg;lutalyse 25mg。
2. 超排处理:在牛发情后第9~12天开始,每天肌注FSH两次,连注4天共8次。剂量:宁波产品为440IU(70,60,50,40),进口FSH-P为34mg(6,5,3,3)。第一次注FSH后48小时再注PG(国产3.6mg,进口35mg),再过48小时或发情后人工输精2~3次(隔12小时)。
3. 采胚:在输精后第7天,术者将采胚管经子宫颈导入子宫角大弯前部并充气固定。用注射器灌注PBS液(每次25~30mL)进行冲洗。最后注PG,剂量与超排相同。
4. 检胚:将回收的冲洗液,注入培养皿中,置于生物镜下检胚并鉴定。可用胚装入塑料细管内并加热加压封口。
5. 移植:胚胎装入移植枪内并套上塑料膜保护套。将枪插入阴道并导入黄体侧子宫角大弯前端后注入胚胎。
6. 孕酮测定:奶孕酮测定按焦淑贤等(1983)^[3]的方法进行。

结果与讨论

(一) 试验结果

1. 超排和移植结果: 试验共超排 222 头, 获卵 1740 枚($\bar{X}=7.8$), 获可用胚 1173 枚($\bar{X}=5.3$)。其中 1988~1989 年超排 100 头, 获卵 923 枚($\bar{X}=9.2$), 获可用胚 650 枚($\bar{X}=6.5$)。1989 年用国产 FSH 超排 23 头, 获卵 327 枚($\bar{X}=14.2$), 获可用胚 242 枚($\bar{X}=10.5$)。共移植 612 头受体黄牛, 受胎率为 47.1%。其中 6 个试验点移植 171 头, 受胎率达 59.1%(101/171)。尤其是 185 号供体牛, 一次超排获可用胚 20 枚并移植妊娠 10 头, 产活 9 头, 见表 1。

表 1 超排和移植结果 单位: 头、枚、%

年度	超排头数	有效反应		采卵成功		采卵		可用胚胎			移植		
		n	(%)	n	(%)	ΣX	$\bar{X} \pm sd$	ΣX	$\bar{X} \pm sd$	%	头数	妊娠数	%
1986	70	63	90.0	55	87.3	458	6.5 \pm 6.4	259	3.7 \pm 4.8	64.4	222	108	48.6
1987	52	49	94.2	45	91.8	359	6.9 \pm 6.6	264	5.1 \pm 5.5	73.5	149	64	43.0
1988	77	73	94.8	60	82.2	596	7.7 \pm 7.4	408	5.3 \pm 5.9	68.5	170	81	47.8
1989	23	23	100	23	100	327	14.2 \pm 8.7	242	10.5 \pm 6.8	74.0	71	35	49.1
合计	222	208	93.7	183	87.9	1740	7.8 \pm 7.3	1173	5.3 \pm 5.9	67.4	612	288	47.7

2. 黄体级别与超排效果: 试验探讨了供体牛超排之前的黄体级别与超排效果关系。其结果如表 2。

表 2 黄体级别与超排效果 单位: 头、枚、%

黄体级别	超排头数	采卵		可用胚胎		退化胚胎		未受精卵	
		ΣX	$\bar{X} \pm sd$	ΣX	$\bar{X} \pm sd$	ΣX	$\bar{X} \pm sd$	ΣX	$\bar{X} \pm sd$
I	55	470	855 \pm 7.1	295	5.36 \pm 5.4	100	1.8 \pm 3.6	75	1.3 \pm 2.6
II	84	605	7.2 \pm 6.9	433	5.15 \pm 5.8	91	1.1 \pm 2.4	81	0.9 \pm 2.4
III	45	288	5.1 \pm 5.8	136	3.02 \pm 4.5	34	0.7 \pm 1.5	58	1.3 \pm 3.8

从表 2 看出: I 和 II 级黄体的获卵数和可用胚数高于 III 级黄体, 方差分析表明其差异显著 ($P < 0.05$), 但 I 和 II 级之间差异不显著 ($P > 0.05$)。

3. 胚胎、黄体级别与受胎效果: 胚胎等级和受体牛黄体级别与受胎效果如表 3。

表 3 胚胎和黄体级别与受胎率 单位: 头、%

受胎率 黄体级别	胚胎级别			
	A	B	C	计
I	52.9(83/157)	60.0(21/35)	0(0/3)	53.3(104/195)
II	50.0(36/72)	45.5(25/55)	22.2(2/9)	46.3(63/136)
III	37.1(13/35)	44.5(16/35)	33.3(8/24)	39.0(37/95)
计	50.0(132/264)	49.2(62/126)	27.8(10/36)	47.9(204/426)

从表 3 看出 A 和 B 级胚胎与 C 级胚胎之间受胎率差异显著 ($P < 0.05$), 而 A 与 B 级胚胎之间受胎率无差异。I 和 II 级黄体与 III 级黄体之间受胎率差异也显著 ($P < 0.05$), 但 I 和 II 级之间无显著差异。

4. 胚胎发育和同期发情与受胎率: 试验观察了不同发育阶段胚胎和供受体牛发情同期化程度与受胎率的关系, 见表 4。

表 4 胚胎发育和发情同期化与受胎率 单位: 头、%

受胎率% 发情同期化程度	胚胎发育阶段					计
	桑椹胚 (M)	晚桑胚 (LM)	早囊胚 (EB)	囊胚 (B)	晚囊及扩囊胚 (LB+E \times B)	
+2	35.7(5/14)	0(%)	44.4(4/9)	60.0(6/10)	16.7(1/6)	40.0(16/39)
+1	15.8(3/19)	42.9(3/7)	69.6(16/23)	33.3(9/27)	57.1(16/28)	45.2(47/104)
0	22.7(5/22)	52.0(13/25)	57.1(32/56)	51.4(19/37)	58.3(21/36)	51.1(90/176)
-1	46.2(6/13)	52.2(12/23)	57.1(12/21)	27.3(3/11)	40.0(2/5)	48.0(35/73)
合计	27.9(19/68)	50.0(28/55)	58.7(64/109)	43.5(37/85)	53.3(40/75)	47.8(188/392)

注: 受体牛发情比供体牛早 1 天, 2 天为 +1, +2, 晚 1 天为 -1, 同期为 0。

从上表看出:不同发育阶段胚胎的受胎率以早期囊胚为最高,桑椹胚最低。经分析除桑椹胚外,其余各发育阶段胚胎受胎率之间差异不显著($P>0.05$);供体与受体牛发情同步者受胎率较高,而+2者为最低。

讨 论

(一)关于超排效果问题

超排技术是胚胎移植的重要环节。长期以来国内外学者们对超排机理及影响因素进行大量研究,但至今仍然很难准确预料和控制超排效果。其影响因素既多又复杂,其中供体牛的饲养管理是基础。科学的饲养是保证供体牛处于良好的营养状态和旺盛的性机能从而获得大量优质胚胎。我们的试验结果表明:供体牛饲养水平高,而且在日粮中有丰富的青绿多汁饲料,可获得较好的效果。如昆明和郑州,分别取得头均可用胚9.8枚和10.5枚;而在徐州和梅河口市,由于饲养管理差,主要缺青饲料和蛋白饲料,结果头均可用胚才分别为4.6和3枚。

供体牛的选择是关键。特别是在超排处理之前,进行直检,根据卵巢状态和有没有功能性黄体,最终确定是否做为供体。一般来说牛膘情中上、年龄4~6岁、无繁殖疾病,经直检子宫和卵巢触感良好,特别是发情后第7~8天,黄体发育良好者则超排效果呈好的趋势。

目前在没有更有效准确预测超排效果的情况下,通过直检根据卵巢和黄体状况及等级^[4],预测超排效果可以说是一项可行的方法。此法对Ⅰ和Ⅱ级黄体比较准确效果也好,但对Ⅲ级黄体,有时出现误差。本试验尽管没有发现孕酮含量同超排效果之间显著相关,但超排前的孕酮测定对鉴别活性黄体和黄体化卵泡,提高供体牛预选准确性,有很大价值。

(二)关于移植成功率问题

影响移植成功率的因素很多。移植成功与否,关键在卵巢上是否具有与发情周期相应的活性黄体。因此,能否准确判定活性黄体及发情时间极为重要。一般Ⅰ和Ⅱ级黄体容易判定,而Ⅲ级黄体与黄体化卵泡容易混淆。尤其是在农户分散饲养的受体黄牛,很难掌握准确的发情时间,这是影响受胎率的主要原因之一。尽管黄体大小不是决定黄体发育、机能强弱及孕酮含量高低的可靠标准^[5],但他们之间有一定的内在联系。我们的试验结果表明,根据黄体大小和其软硬度及卵巢触感评定级别,有助于提高受胎率。

胚胎质量好坏,是提高移植成功的前提,而且胚胎发育阶段不同对受胎率有影响。因此,正确鉴定胚胎质量及其发育阶段是一个主要环节。一般来说,A和B级胚胎及囊胚受胎率高于C级胚胎和桑椹胚。

供、受体牛的发情同期化与受胎率有密切相关。因此,做好受体牛的发情观察和记录对提高受胎率有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 铃木运行:北アメリカにあげる新しい牛の繁殖技术,《畜产の研究》,1989年,43卷,12期,1363~1368。
- [2] 罗应荣:全国奶牛胚胎移植技术研讨会资料,《国外畜牧科技》,1989年,1期,20。
- [3] 焦淑贤等:测定奶牛孕酮含量进行奶牛早期妊娠诊断的研究,《中国畜牧杂志》,1983年,1月,4~6。
- [4] 砂川、政广等:牛受精卵移植における受卵(胚)牛の黄体形状及び血中プロジェステロン値と移植成绩,December 1987 Jpn J Anim Reprod, 33(4), 206~208。
- [5] N. Pathiraja et al (1986) Accuracy of rectal palpation in the diagnosis of corpora lutea in zuhu cows, Br. vet., J. 142: 467.