

分类号: S814.8

U D C: 591.3(043)

西北农林科技大学

2003届攻读硕士学位研究生学位(毕业)论文

牛、羊胚胎移植技术研究与应用

学科、专业: 临床兽医学

研究方向: 哺乳动物胚胎工程

研 究 生: 杨 炜 峰

指导教师: 窦 忠 英 教 授

完 成 日 期: 2003年6月

中国 杨凌

学 校 代 码： 10712

研 究 生 学 号： S00246

牛、羊胚胎移植技术研究与应用

杨炜峰

国家自然科学基金（30070374）和陕西省攻关项目资助

提交论文时间： 2003 年 6 月

论文答辩时间： 2003 年 6 月

学位授予时间： 2003 年 7 月

Dissertation for Master's Degree

School code : 10712

Sequence number : S00246

Research and Application of Embryo Transfer in Cattle and Goats

Specialty : Clinic Veterinary Medicine

Study Area : Mammal Embryonic Engineering

Postgraduate : Yang Weifeng

Advisor : Prof. Dou Zhongying

Submitted time : June, 2003

Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry

目 录

文献综述

第一章 牛、羊胚胎移植技术的现状与展望.....	1
§1 牛、羊胚胎移植技术的研究进展	1
§1.1 国际牛胚胎移植的状况	2
§1.2 国际绵羊与山羊胚胎移植状况	5
§1.3 国际其它种类家畜和动物胚胎移植状况	5
§1.4 国内胚胎移植的状况	6
§2 牛、羊同期发情技术的研究进展	10
§2.1 同期发情技术中的相关激素	10
§2.2 牛同期发情技术的研究状况	12
§2.3 羊同期发情技术的研究状况	15
§3 牛、羊超数排卵技术的研究进展	16
§3.1 牛超数排卵技术的研究进展	16
§3.2 羊超数排卵技术的研究进展	18
§4 牛、羊同期发情与超数排卵技术的优化思路	18
§4.1 牛同期发情与超数排卵技术的优化	18
§4.2 羊同期发情与超数排卵技术的优化思路	21
§5 目前同期发情与超数排卵研究的热点与难点	22
§5.1 目前研究的热点	22
§5.2 目前研究的难点	24
§6 本研究的设想与依据	25
§7 结束语	26

试验研究

第二章 牛胚胎移植技术的研究与应用	27
§1 引言	27
§2 材料与方法	28
§2.1 材料	28
§2.2 方法	28
§3 结果	29
§3.1 牛超数排卵的效果	29

§3.2 牛同期发情结果	30
§3.3 牛胚胎移植结果	30
§4 讨论	31
§4.1 FSH 剂量对母牛超排效果的影响	31
§4.2 去栓时间对母牛超排效果的影响	31
§5 小结	31
第三章 波尔山羊胚胎移植技术的研究与应用	32
§1 引言	32
§2 材料与方法	32
§2.1 材料	32
§2.2 方法	33
§3 结果	34
§3.1 不同药物与剂量处理对供体波尔山羊超排效果的影响	34
§3.2 供、受体羊不同去栓时间对发情同期化的影响	36
§3.3 影响受体妊娠率和产羔率的因素	36
§3.4 “白黄体”供体羊胚移结果	38
§4 讨论	38
§4.1 影响波尔山羊超排效果的因素	38
§4.2 供受体发情同期化程度	40
§4.3 影响受体妊娠率的因素	40
§4.4 “白黄体”供体羊超排与移植效果的研究	41
§5 小结	41
§5.1 影响供体超数排卵效果的因素	41
§5.2 提高供受体羊同期化程度	41
§5.3 影响受体妊娠率的因素	42
§5.4 “白黄体”供体羊胚胎移植效果	42
参考文献	43
致 谢	49
个人简介	50

摘 要

牛、羊胚胎移植技术中,供受体同期化程度不理想、超排效果不稳定以及相关指标不系统是制约其商业化应用的几个关键性问题。本研究以西北农林科技大学奶牛胚胎移植试验站为依托,与7家养殖公司协作进行,结果如下:

1. 在荷斯坦奶牛应用“PG+P₄+FSH”的超排方案中,①不同去栓时间(分别在第7次和第8次注射FSH时去栓)卵巢平均黄体数(5.5 ± 0.5 个和 6.0 ± 1.3 个)差异不显著($P > 0.05$);平均采胚数(4.0 ± 0.0 枚和 7.5 ± 3.3 枚)差异不显著($P > 0.05$);平均可用胚数(3.0 ± 0.0 枚和 2.8 ± 0.9 枚)差异不显著($P > 0.05$)。②FSH(Folltropin-V,澳大利亚产)的剂量分别为400mg与440mg时,平均冲胚数分别为 4.0 ± 0.0 枚和 7.3 ± 1.9 枚,二者差异不显著($P > 0.05$)。

2. 在波尔山羊应用“PG+P₄+FSH”的超排方案中,①方案1与方案2(方案1比方案2去栓时间晚6h)相比,两组平均黄体数(33.3 ± 2.2 个和 23.5 ± 1.6 个)差异显著($P < 0.05$);但平均冲胚数(22.4 ± 2.3 枚和 20.4 ± 2.0 枚)和平均可用胚数(20.9 ± 2.0 枚和 18.8 ± 2.1 枚)差异不显著($P > 0.05$)。②中科院动物所产FSH和澳大利亚产FSH(Folltropin-V)对波尔山羊超排的效果差异不显著($P > 0.05$);中科院产FSH(9mg与11mg),澳大利亚产Folltropin-V(360mg与440mg),不同剂量间的超排效果差异均不显著($P > 0.05$)。③在陕西,8~11月份对波尔山羊进行超排(平均冲胚数分别为 22.4 ± 2.3 枚、 17.8 ± 2.2 枚和 19.3 ± 5.5 枚;平均可用胚数分别为 20.9 ± 2.1 枚、 16.0 ± 2.0 枚和 14.6 ± 5.3 枚),其效果无显著差异($P > 0.05$)。

3. 以波尔山羊为供体、关中奶山羊为受体,当受体比供体提前12h,6h或同时去栓时的同期率无显著差异(73.8%、80.7%和73.1%, $P > 0.05$)。

4. 受体羊(关中奶山羊)黄体体积的大小对胚胎移植妊娠率的影响差异不显著(黄体体积大、中、小对应的妊娠率分别为69.6%、56.0%和71.4%, $P > 0.05$)。

5. 移植三胚、双胚与单胚的受体羊(关中奶山羊)间妊娠率差异不显著(78.8%、61.9%和61.8%, $P > 0.05$)。移双胚产双羔的百分率为32.4%(55/170)。

6. 供体羊黄体为“白黄体”和正常黄体时,两者超排卵巢反应差异不显著(平均黄体数分别为 16.2 ± 1.1 个和 20.1 ± 1.1 个, $P > 0.05$);平均冲胚数(4.3 ± 2.4 枚和 17.1 ± 1.3 枚)和平均可用胚数(4.3 ± 2.4 枚和 15.0 ± 1.3 枚)差异极显著($P < 0.01$);每只供体获羔羊数差异显著(1.7 ± 0.9 只和 5.2 ± 0.6 只, $P < 0.05$)。“白黄体”组与正常黄体组胚胎移植妊娠率分别为66.7%(8/12)和57.5%(207/360),二者差异不显著($P > 0.05$)。

关键词: 牛,羊,超数排卵,同期发情,胚胎移植

ABSTRACT

The commercial application of embryo transfer (ET) in cattle and goats was restricted by the ordinary estrous synchronization, unstable superovulation and unsystematic related index. This research was supported by the Bovine Embryo Engineering Institute of NWSUAF and 7 Farms. The result was as follows:

1. In the bovine superovulation procedure of Holstein by using PG, P₄ and FSH: ① The number of corpus luteum (CL) was not significant different by different time removing the CIDR-B at the 7th and 8th FSH administration (5.5 ± 0.5 vs 6.0 ± 1.3 , $P > 0.05$). The number of total embryos (4.0 ± 0.0 vs 7.5 ± 3.3) and transferable embryos (3.0 ± 0.0 vs 2.8 ± 0.9) were not significant difference ($P > 0.05$). ② The Flushing total embryos (4.0 ± 0.0 vs 7.3 ± 1.9) by using different Folltropin-V dose 400 and 440 mg respectively were not significantly different ($P > 0.05$).

2. In the superovulation procedure of Boer goats by using PG, P₄ and FSH, ① In different procedures (Procedure 1 removes CIDR or PRID later 6h than procedure 2), the number of CL was significant difference (33.3 ± 2.2 vs 23.5 ± 1.6 , $P < 0.05$), the number of total embryos (22.4 ± 2.3 vs 20.4 ± 2.0) and transferable embryos (20.9 ± 2.0 vs 18.8 ± 2.1) was not significant ($P > 0.05$). ② The results of superovulation hadn't distinguished difference using the different kinds of FSH (produced in Australia and Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences) and different dose ($P > 0.05$). ③ The superovulatory results hadn't distinguished difference (total embryos was 22.4 ± 2.3 , 17.8 ± 2.2 vs 19.3 ± 5.5 , transferable embryos was 20.9 ± 2.1 , 16.0 ± 2.0 vs 14.6 ± 5.3 , $P > 0.05$) from August to December in Shaanxi.

3. Boer goats were used as the donors and Guanzhong dairy goats as the recipients in the study. The estrous synchronization rates among the recipient's earlier 12h, 6h and 0h were not significantly different (73.8%, 80.7% vs 73.1%, $P > 0.05$).

4. In the studies of relationship between the volume of CL and pregnancy, the pregnancy rates between recipients with different size of CL were not significantly different (69.6%, 56.0% vs 71.4%, $P > 0.05$).

5. The pregnancy rate of the recipients transferred 1, 2, 3 embryos was not significantly different (78.8%, 61.9% vs 61.8%, $P > 0.05$). The recipient's ratio of producing twin kids which transferred 2 embryos was 32.4% (55/170).

6. The ovarian responses between the "white" and normal CL goats were not significantly different (the numbers of CL are 16.2 ± 1.1 vs 20.1 ± 1.1 respectively, $P > 0.05$). Total embryos (4.3 ± 2.4 vs 17.1 ± 1.5) and transferable embryos (4.3 ± 2.4 vs 15.0 ± 1.3) were significantly different ($P < 0.01$). The kids of every donor were significantly different (1.7 ± 0.9 vs 5.2 ± 0.6 , $P < 0.05$). The pregnancy rates of recipients were not affected (66.7% vs 57.5%, $P > 0.05$).

Key words: Cow; Goat; Superovulation; Estrous Synchronization; Embryo transfer

文献综述

第一章 牛、羊胚胎移植技术的现状与展望

牛、羊胚胎移植技术的商业化应用已有 30 多年的历史。国际上, 牛的胚胎移植所占比例最大, 其次为绵羊和山羊的胚胎移植, 其它种类家畜和动物的胚胎移植 (如: 猪、马、鹿、美洲驼、羚羊等) 的研究和应用也十分活跃。国内牛、羊胚胎移植起步比发达国家晚一些, 直到近 10 年来, 其规模才逐渐扩大。特别近 4 年来, 波尔山羊胚胎移植的规模很大, 二十多个省份应用此项技术进行了波尔山羊的快速扩繁。根据国际胚胎移植协会 (IETS) 的统计, 2000 年全世界移植牛胚胎总数达 528 540 枚, 绵羊胚胎总数达 13 769 枚, 山羊胚胎总数达 9 912 枚。可以看出胚胎移植已经发展成为畜牧业中最具生机和活力的应用技术领域之一 [117-122]。

§ 1 牛、羊胚胎移植技术的研究进展

胚胎移植最早于 1890 年在兔子上试验成功, 至今已有 100 多年的历史。该技术的研究成就在表 1 作一简要回顾。

表 1 胚胎移植技术研究的成就回顾

研究者 (Author)	类别 (Species)	成就 (Event)
Heape, 1890	兔子 (Rabbit)	首次胚移成功 (First successful embryo transfer)
Beidl et al., 1922	兔子 (Rabbit)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Nicholas, 1933	大鼠 (Rat)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Warwick and Berry, 1934	绵羊 (Sheep)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Warwick and Berry, 1949	山羊 (Goat)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Kvansnickii, 1951	猪 (Pig)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Willett et al., 1951	牛 (Cattle)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Marden and Chang, 1952	兔子 (Rabbit)	首次洲际间运送胚胎 (First intercontinental shipment of embryos at 10°C)
Chang, 1968	雪貂 (Ferret)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Alberta Livestock Transplants, Ltd., (Dr. D. C. Kraemer), 1971	牛 (Cattle)	首次成立商业性胚移公司 (First commercial company formed for embryo transfer in farm animals)
Whittingham et al., 1972	小鼠 (Mouse)	冷冻胚胎成功 (Successful frozen embryos)
Wilmot and Rowson, 1973	牛 (Cattle)	冷冻胚胎后代产生 (Offspring produced from frozen embryos)
Oguri N and Tsutsumi Y., 1974*	马 (Horse)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Kraemer et al., 1978	狒狒 (Gelada)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Schrivier et al., 1978	猫 (Cat)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Steptoe and Edwards, 1978	人 (Human)	胚移女婴诞生 (Baby girl born after embryo transfer)
Kinney et al., 1979	犬 (Dog)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Bavister, 1983*	猴 (Monkey)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Mayar, 1983*	鹿 (Deer)	胚移成功 (Successful embryo transfer)
Wilson-Wiepz, 1985*	骆驼 (Llama)	胚移成功 (Successful embryo transfer)

△ 没有*号者资料见参考文献^[86]

* 资料见参考文献^[102, 92, 104, 127]

§ 1.1 国际牛胚胎移植的状况

国际胚胎移植协会 (IETS), 作为一个促进家畜胚胎移植及相关技术发展的全球性组织, 成立于 1974 年。每年在其网站上公布上一年度的国际胚胎移植状况。其数据来源于美国胚胎移植协会 (AETA)、加拿大胚胎移植协会 (CETA)、欧洲胚胎移植协会 (AETE) 和其他国家的胚胎移植协会或相关机构。主要提供各大洲及一些国家和地区的胚胎移植相关数据, 如各种动物的供体数、可用胚数、冻胚数、鲜胚数、储存和进出口的胚胎数等。目前没有关于妊娠率、产犊率等方面的报道, 可能与这类数据统计周期长、收集困难有关。根据 IETS 的统计, 1991 年全世界移植牛胚胎总数为 240 730 枚, 1995 年牛胚移总数首次超过 40 万枚, 2000 年创造 50 多万枚的新记录 (见图 1)。

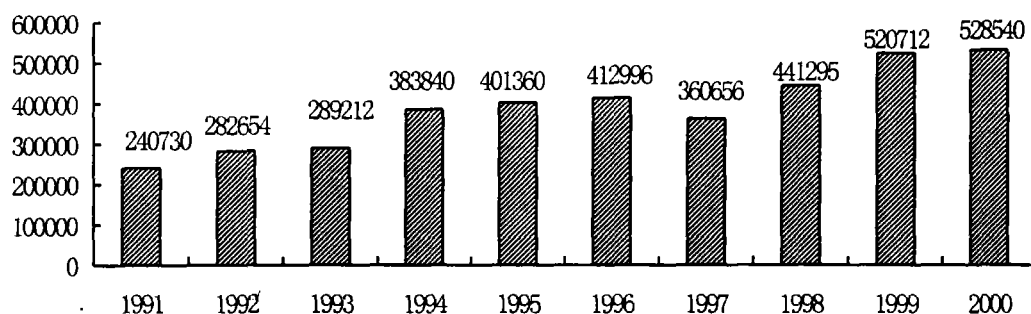


图 1 1991 至 2000 年世界牛移胚总数统计表 (单位: 枚)

根据 IETS 2000 年的统计, 平均每头供体牛采得可用胚约 6 枚, 鲜胚妊娠率平均为 62%, 冻胚妊娠率平均为 54%, 以 IETS 提供的胚移妊娠率为参考 (按 60% 计), 全世界在该年有 30 多万头胚移牛产生。而且 IETS 的统计数据还未能包括世界上所有的地区, 特别是亚洲地区, 因此这些数据比实际要低一些。可以看出胚胎移植已成为畜牧业中最具前景的实用繁殖技术之一^[117-122]。因为畜牧业的现代化 (即家畜良种化、饲养管理科学化、生产方式工厂化) 的实现, 其中心是提高优良家畜的繁殖效率。如果繁殖率低下, 优良家畜的数量扩大受到限制, 畜群的质量就得不到提高, 则奶、肉、毛等畜产品的增加就都成了空话^[28]。胚胎移植可以使优良母畜的繁殖率得到很大的提高, 从而给养殖者带来了更大的收益。在牛的胚胎移植中, 有几个数据为人们所关注: (1) 供体牛品种的分布: 品种间的分布比例是基本相同的。包括荷斯坦牛、利木赞牛、Blond d'Aquitaine 牛, 西门塔尔牛, Zebu 牛, 安格斯牛, 夏洛来牛等。1996 年 IETS 的数据统计认为肉牛与奶牛的比例也基本相同^[122]。此外, 有一个显著的特征是, 胚胎移植的状况因地域不同有很大差异, 如 2000 年加拿大胚移中有 74% 的供体为奶牛品种, 26% 的供体为肉牛品种; 而同期美国胚移中有 39% 的供体为奶牛品种, 61% 的供体为肉牛品种^[120]。(2) 可用胚数目: 每头供体所得可用胚数在 5-6 枚之间。1995 年至 2000 年全世界每头供体牛所得可用胚数目平均

为 5.57 枚 (496808/89207)、5.41 枚 (477875/88310)、5.54 枚 (456258/82307)、5.50 枚 (528688/96177)、6.00 枚 (714356/119164)、5.88 枚 (664320/113058), 可以看出近年来超排技术基本稳定, 说明超排处理方法已经被很好地掌握。(3)鲜冻胚移植比例: 鲜胚移植与冻胚移植的比例基本持平。通过近五年的统计比较可以发现, 二者比例非常接近, 但冻胚移植总数有一定提高 (见表 2)。因为胚胎贸易与胚胎冷

表 2 1995 至 2000 年世界牛胚移状况统计表 (单位: 枚)

年份	供体总数	冲胚总数	鲜胚移植总数	冻胚移植总数	鲜胚与冻胚总数比较 (鲜/冻)
1995	89207	496808	209014	192346	1.09: 1
1996	88310	477875	212894	200102	1.06: 1
1997	82307	456258	168373	192283	0.88: 1
1998	96177	528688	220223	221072	0.99: 1
1999	119164	714356	255732	264980	0.97: 1
2000	113058	664320	246156	282284	0.87: 1

冻贮存是紧密相连的。在 1995 年全世界约有 15 万枚胚胎被冻存, 其中 62 000 枚在欧洲, 加拿大有 42 000 枚; 在 1996 年大约有 10 万枚胚胎被冻存; 1997、1998、1999 年没有冻胚的准确数据。但据 IETS 推测, 全世界冻存的胚胎数大概占每年胚移总数的一半以上, 2000 年全世界冻胚移植总数为 282284 枚, 约占移植总数的 53% (282284/528540), 可见冻胚比例在不断升高。(4) 胚胎生产方式: 体内方式生产胚胎的规模继续扩大, 体外方式生产胚胎的研究与应用继续加强。虽然目前胚胎移植所用的胚胎绝大部分为体内方式生产的胚胎, 但是体外方式生产胚胎的数量正在增加。对于体外方式生产胚胎的数据, IETS 是从 1996 年开始收集统计的。1996 年大约有 1 万枚被用来移植, 1997、1998、1999 年各约有 3 万枚被用来移植, 2000 年有 4 万多枚被用来移植 (见表 3)。可以看出, 应用 IVF (体外受精) 生产胚胎的技术还没有达到大规模商业化应用的程度。虽然, 在 1997 年, 意大利和荷兰已经

表 3 1995 至 2000 年通过体外受精获得牛胚胎的移胚状况统计表 (单位: 枚)

年份	用体外方式获得可用胚总数	鲜胚移植总数	冻胚移植总数	移植总数
1995	? *	? *	? *	? *
1996	10280	?	?	12669
1997	41432	12018	18551	30569
1998	85026	16269	15058	31327
1999	166794	13298	13654	26952
2000	139372	27967	13794	41761

* 国际胚胎移植协会首次将体内与体外两种获得胚胎方式分开, 但未获得准确数字

? 表示没有相关数据

成立了向牧民出售体外生产胚胎的专门公司, 但至今还未能大规模普及。现在全世界约有 50 个研究小组在进行这方面的商业化应用与开发, 1999 年采集到约 166000 个卵母细胞^[121]。日本在这个方面具有优势, 1999 年大约有 8000 枚体外生产胚胎用于移植, 其中 60% 为冻胚移植。根据 AETE (欧洲胚胎移植组织) 的统计, 2000 年, 在欧洲通过体外方式生产的可用胚胎 (均为囊胚) 为 26 520 枚。其中通过活体采卵技术 (OPU), 从 1035 头供体牛上共采卵 8 843 次, 平均每头供体 8.54 次, 经

过体外培养共得到 14 079 个囊胚用于移植, 平均每头供体每次获得可用胚 1.59 枚; 从屠宰场收集的卵母细胞经体外成熟、体外受精、体外培养后共得到 12 441 枚囊胚。由这些数据可以看出, 卵母细胞的两种来源方式在体外生产的囊胚总数接近 ($14079/12441=1.1:1.0$)^[120]。虽然没有关于卵裂率、桑囊率的报道, 但依每头供体活体采卵每次采集平均 4-6 个卵母细胞来看, 其囊胚发育率为 26%-40%。2000 年, 加拿大体外方式生产牛胚胎 552 枚, 日本报道已经移植了 3697 枚鲜胚、5146 枚冻胚。韩国有 14 158 枚来自于屠宰场方式生产的胚胎, 其中 1/6 为冻胚移植。此外, 韩国移植了 2526 枚通过核移植方式生产的胚胎。尽管, 在这些数据中, 商业性的胚胎移植与实验性的胚胎移植可能混在一起, 但从以上数据可以看出, 体外方式生产胚胎的研究与开发在进一步加强。(5) 妊娠率: 由于技术经验的积累, 移植后的妊娠率总体上在缓慢的提高。尽管由于品种、地区的不同, 妊娠率有所差别, 但可以比较其平均水平。1995 年, 全世界鲜胚移植妊娠率平均为 62%, 冻胚移植妊娠率平均为 48%; 从 1996 年以后, IETS 没有完整的妊娠率方面的相关数据 (因为 IETS 认为收集数据的质量源于每个组织, 而许多组织缺乏妊娠率方面的信息, 因此公布这方面的数据还不现实)。但有一点, 对于胚胎移植技术成熟的国家, 其妊娠率相对较高, 如 1999 年法国鲜胚移植妊娠率为 64%, 冻胚移植妊娠率为 50%; 2000 年加拿大 (资料来源于全加拿大 64 所兽医诊所的胚移报告总结) 鲜胚移植妊娠率为 62.1% (14652/23579), 冻胚移植妊娠率为 58.9% (14524/24644)^[93]。对于通过体外受精方法生产的胚胎, 其妊娠率的资料较少, 2000 年, 加拿大胚移总结中, 体外生产胚胎的妊娠率: 鲜胚为 48% (150/314), 冻胚为 37% (87/238)^[93]。可以看出, 随着研究的深入, 体外方式生产胚胎的技术也会大规模应用。(6) 地理分布: 胚胎移植技术应用的情况在全世界分布不均衡。北美和欧洲胚移技术应用最广泛, 后面依次为亚洲、南美洲、大洋州和非洲, 见表 4。其中胚移技术应用较多的国家有美国、加拿大 (北美), 法国、德国等 (欧洲), 日本、韩国 (亚洲), 巴西、阿根廷 (南美), 澳大利亚、新西兰 (大洋州), 南非 (非洲)^[117-122]。

表 4 1995 至 2000 年世界牛胚胎移植地理分布情况统计表 (单位: 枚)

年份	北美	欧洲	亚洲	南美	大洋洲	非洲
1995	174619 (43%)	112703(28%)	50936(12.7%)	41513(10.3%)	12232(3.1%)	9357(2.3%)
1996	124953 (34.5%)	127522(35.4%)	49724(13.8%)	35254(9.8%)	14437(4.0%)	8766(2.4%)
1997	169201(41%)	111321(27%)	64119(15.5%)	49861(12%)	8354 (2%)	10140(2.5%)
1998	169833(45%)	120360(27.4%)	47242(10.7%)	64047(14.5%)	9802(2.2%)	3011(0.7%)
1999	197866(38.0%)	129780(24.9%)	50171(9.6%)	93352(18%)	43808(8.4%)	5715(1.1%)
2000	224451 (42.5%)	105968(20.1%)	58971(11.1%)	84521(16.0%)	47866(9.0%)	6763(1.3%)

* 括号中的百分比表示该洲胚移总数所占当年全世界胚移总数的百分比

§ 1.2 国际绵羊与山羊胚胎移植状况

对于绵羊和山羊，其胚胎移植的数量和分布不象牛那样高和广泛，这些动物的胚胎移植有明显的地域特色。根据 IETS 统计（见表 5）和相关资料报道，将世界山羊与绵羊的胚胎移植的现状总结如下^[117-122]：（1）品种：已报道的品种很多，山羊

表 5 1995 至 2000 年世界绵羊胚移状况统计表（单位：枚）

		1995	1996	1997	1998	1999	2000
绵羊	供体总数	1, 260	154	283	2, 288	9, 514	2, 846
	获可用胚总数	6, 532	509	1, 226	17, 091	60, 129	18, 781
	移植胚胎数	6, 466	1, 581	1, 252	16, 843	13, 769	13, 769
山羊	供体总数	1, 771	65	912	1, 534	2, 580	1, 504
	获可用胚总数	18, 210	110	7, 801	16, 363	20, 003	11, 492
	移植胚胎数	11, 523	2, 060	9, 619	2, 551	11, 860	9, 912

有波尔山羊（Boer）、安哥拉山羊（Angora）、沙能山羊（Saanen）等；绵羊品种有杜泊羊（Dorper）、萨福克羊（Suffolk）、陶赛特羊（Dorset）、美利奴羊（Merino）等。（2）地理分布：绵羊和山羊的移植数据主要来源于大洋州、中国、南非、北美和欧洲，胚移总数在 1 万枚以上。但不同国家、地区之间差别很大；（3）鲜胚与冻胚移植的比例：每年变化较大。1995-1999 鲜胚移植占优势，2000 年冻胚移植较多。另外冷冻保存的胚胎数呈递增趋势，这可能与每头供体获得较多的可用胚胎数有关。（4）移植妊娠率与产羔率：国内外报道的资料变异范围较大，鲜胚移植妊娠率为 40%-80%，冻胚移植妊娠率在 30%-50%。（5）平均获可用胚数目：因品种而存在较大差异。绵羊每头获可用胚数平均 4-6 枚，山羊平均 8-10 枚。（6）胚胎贸易：胚胎贸易受到某些环境因素（如疾病爆发）和全球经济减退的影响出现波动，但胚胎贸易仍呈增长趋势。此外，收集到的胚胎数与实际胚胎移植数相差很大，有相对较多的胚胎被冷冻保存。在地理分布上，有明显的地域特色，如新西兰和澳大利亚，羊是其主要产业之一^[54]。

§ 1.3 国际其它种类家畜和动物胚胎移植状况

其它种类动物胚胎移植，如：猪、马、鹿、美洲驼、羚羊等，也十分活跃（见表 6）。马的胚胎移植较多的国家是美国和阿根廷，另外欧洲（捷克、法国和英国）、南非、加拿大、墨西哥等也应用了这项技术，还有澳大利亚和阿拉伯国家。猪的胚胎移植活动主要在北美（特别是加拿大）、欧洲（捷克、新西兰和法国）、亚洲（韩国和台湾地区）。兔的胚胎移植的报道主要来自法国，还有台湾地区。此外，也有羚羊、骆驼和一些珍稀动物实验性胚胎移植的报道，但数量较少，未列入表中^[117-122]。

表 6 1995 至 2000 年其它种类家畜和动物胚胎移植状况统计表

年份	马	猪	鹿
1995	?	?	195
1996	?	?	?
1997	?	?	495
1998	4383	11264	1281
1999	525 (?)	8071	1730
2000	5398	9043	1499

? 表示没有相关数据或数据不准确

§ 1.4 国内胚胎移植的状况

在国内,家畜胚胎移植技术起步较晚。1973 年开始在三北羊上进行,1974 年产生羔羊。牛的胚胎移植从 1975 年开始,1978 年在上海牛奶公司第七牧场产出第一头犊牛(当时每头供体牛采胚约 1.5 枚,妊娠率约为 28%)^[28]。进入 80 年代后,全国有十几个省区的 20 多个单位先后开展了此项工作。由于没有解决好技术和组织工作中的若干问题,几起几落,多数省区研究工作结束后就停了下来。1991-1995 年间,胚胎移植技术逐渐成熟,年均超排处理供体牛 300-500 头次;1995 年以后,胚胎移植规模有所扩大,超排处理供体牛年平均在 400-800 头次。羊的胚胎移植在 1999 年以后,出现了波尔山羊、陶赛特和杜泊绵羊的移植热潮。目前,我国家畜胚胎移植技术的应用推广发展较快,有 20 多个省市开展了此项业务。表 7 为国内胚胎移植技术的研究状况^[2,7,13]。

表 7 国内家畜胚胎移植技术研究成果

研究者(年代)	动物类别	实验成就
陈玉琦(1973)	兔子	胚移成功
中科院遗传所(1976)	兔子	胚胎低温(10℃)保存产仔
中科院遗传所(1980)	兔子	-196℃保存胚胎产仔
中科院遗传所(1974)	绵羊	胚移成功
谭丽玲、郭志勤(1976)	绵羊	胚胎低温(10℃)保存产羔
中国农科院畜牧所(1980)	绵羊	-196℃保存胚胎产羔
郭志勤等(1992)	绵羊	鲜胚分割四分胚产羔
王建辰等(1980)	奶山羊	胚移成功
王光亚等(1987)	奶山羊	冷冻胚胎产羔
张涌(1987)	奶山羊	胚胎分割移植成功
窦忠英等(2002)	波尔山羊	鲜胚分割,同卵双生产羔
广东协作组(1978)	奶牛	手术法胚移成功
王运京、王秀阁(1980)	奶牛	非手术法胚移成功
姚振沅、谭丽玲(1982)	奶牛	-196℃保存胚胎产犊
窦忠英等(1986)	奶牛	鲜胚二分割产犊
谭丽玲、马世援(1989)	奶牛	鲜胚分割同卵双生产犊
郭志勤(1989)	奶牛	冻胚分割同卵双生产犊
谭丽玲(1989)	奶牛	鲜胚分割四分胚产犊
窦忠英等(1992)	奶牛	鲜胚四分割,生同卵三犊
高建明、吴学清(1994)	奶牛	分割胚胎性别鉴定

1.4.1 国内牛胚胎移植的状况

近年来,国内牛胚胎移植技术的研究与推广应用步伐很快,下面对这一状况作

一汇总。“八五”期间，由北京奶牛中心等单位承担农业部攻关项目“奶牛 MOET 核心群的建立”，截止 1995 年 9 月底累计处理供体牛 278 头次，平均获可用胚 6.3 枚；以荷斯坦牛为受体移植 1214 头次，妊娠 658 头次，总妊娠率为 54%，其中青年受体牛鲜胚的妊娠率高达 70% (240/343)，冻胚为 53% (133/251)。“九五”期间，牛胚胎移植技术分别列入国家攻关、“863”中试和农业部重点项目。“九五”攻关项目由中国农业科学院畜牧所与黑龙江、山东、河南、山西等地联合承担，五年来累计处理供体肉牛 545 头、平均获可用胚 5.6 枚；处理奶牛 827 头，平均获可用胚 5.9 枚；肉牛胚胎移植受体牛 4971 头次，妊娠率为 51.3% (其中有部分鲜胚)，奶牛移植受体牛 394 头次，妊娠率为 51.5% (以冻胚为主)。“863”中试项目“牛胚胎移植技术产业化研究”由新疆新科力生物技术与研究所与宁夏农业科学院畜牧研究所联合承担，从新西兰、加拿大、美国进口安格斯肉牛、西门塔尔牛、利木赞牛胚胎 1762 枚 (新疆 1300 枚，宁夏 462 枚)。1998~2001 年 4 月，新疆累计生产各类牛胚胎 4743 枚、宁夏生产 706 枚，总计移植 5272 头次。其中新疆鲜胚移植妊娠率为 53.38% (2005/3756)，冻胚移植妊娠率为 50.11% (1413/2820)。农业部的重点项目由内蒙古家畜改良工作站承担，从加拿大进口 3000 枚肉牛胚胎，并利用内蒙古宝克种畜有限公司的安格斯肉牛、海福特肉牛生产胚胎，据报道，累计处理供体肉牛 435 头次，平均获可用胚 5.15~6.78 枚；该站自 1992~1999 年累计移植受体牛 4862 头次，总妊娠率为 47.84%^[14]。2002 年 4 月 15 日，农业部“万枚高产奶牛胚胎移植富民工程”项目在北京奶牛中心延庆基地正式启动。由于国内没有专门收集这类数据的组织，仅将报道的数据列于下面表中，其中表 8 为“八五”期间，由北京奶牛中心等单位承担的农业部攻关项目“奶牛 MOET 核心群的建立”项目^[3]；表 9~表 13 为“九五”期间，由新疆新科力生物技术与研究所与宁夏农业科学院承担的“863”中试项目“牛胚胎移植技术产业化研究”。

表 8 北京奶牛中心 1992-1995 年超排和移植结果统计表

年度	头次	黄体数	总卵数	可用胚	异常数	鲜 ET 数	冻胚数	妊娠数	犊牛数
1992	116	1088	849	580	263	383	177	208	219
1993	87	889	759	553	208	382	145	149	170
1994	92	1010	837	551	261	367	190	178	193
1995	12	144	119	84	33	9	74	-	-

表 9 新疆 1998-2001 年胚移情况统计表

年度	供体数	回收胚数	可用胚数	平均可用胚
1998	66	501	325	4.57
1999	187	1350	1017	5.44
2000	272	2385	1496	5.50
2001 (至 5 月底)	281	2397	1905	6.77
总计	806	7333	4743	5.88

表 10 宁夏 1998-2001 年胚移情况统计表

年度	供体数	回收胚数	可用胚数	平均可用胚
1998	5	38	31	6.20
2000	36	345	281	7.81
2001	13	67	48	3.69
总计	54	450	360	6.67

表 11 新疆 1998-2001 年不同品种牛超排效果统计表

品种	供体数	回收胚	可用胚	平均可用胚
西门塔尔	319	2819	1893	5.93
荷斯坦牛	399	3632	2235	5.60
安格斯牛	88	882	615	6.99

表 12 宁夏进口冻胚移植结果统计表

品种	移植数(头)	妊娠数(头)	妊娠率(%)
利木赞	134	60	44.78
夏洛来	37	21	56.76
西门塔尔	22	10	45.45
荷斯坦牛	35	20	57.14
总计	228	111	48.68

表 13 新疆鲜、冻胚移植结果统计表

年份	鲜胚移植头数	冻胚移植头数	鲜胚移植妊娠率(%)	冻胚移植妊娠率(%)
1998	169	421	57.99(98/169)	46.08(194/421)
1999	332	875	64.16(213/332)	45.03(394/875)
2000	435	1524	64.60(281/435)	54.13(825/1524)
总计	936	2820	63.25(592/936)	50.11(1413/2820)

从以上数据可以看出：(1) 不同品种的超排效果不同，如表 10 中安格斯牛平均每头供体获可用胚 6.99 枚，而荷斯坦牛平均每头供体获可用胚 5.60 枚。(2) 获可用胚数目，在 5-7 枚之间（表 9、表 10、表 11、表 12）。(3) 妊娠率：国内鲜胚移植妊娠率为 57%-65%，冻胚移植妊娠率为 46%-57%。以上数据与 IETS 的统计指标基本接近，说明国内牛胚胎移植技术已经成熟，其应用的规模在逐渐扩大。此外，也有许多进口胚胎的报道^[9,14]。

1.4.2 国内羊胚胎移植的状况

近年来，国内羊胚胎移植的应用规模也较大。余文莉等 1991~1996 年对 9 个品种 408 只绵羊处理，共得到 4002 枚胚胎，平均每头供体 9.81 ± 4.64 枚^[40]。1999 年底，有报道称香港屹昌科技集团和美国 CCI 集团在内蒙古锡盟乌拉盖草原启动首例万枚澳大利亚多赛特和陶赛克绵羊的胚胎移植工作，1.2 万枚胚胎移植给当地万余只母羊^[16]。

表 14 中列出收集到的实验性羊胚胎移植实验报道^[8,11,18,20,25,50,51]。国内许多省份开展了商业性的胚胎移植活动，现将收集到的数量在千枚以上的胚胎移植报道在表 15 中统计^[15,40,51]。由于国内没有专门收集这些数据的协会和组织，而且很难从报

道上将实验性与商业性的数据分开，因此某些数据很可能混淆在一起。

表 14 近年来国内羊胚移状况统计表

单位	作者	品种	供体数 (头)	可用胚数 (枚)	移植受数 (头)	妊娠率 (%)
内蒙古自治区 畜牧科学院	赵霞等	德国美利 奴羊	28	385	326	77.61 (253/326)
吉林省农业科学院	刘积凤等	优质细毛羊 和澳斯羊	33	208	156	67.3 (103/156)
内蒙古科右前旗 家畜改良站	屈中泽等	罕山白绒 山羊	—	36(冻胚)	36	69.74 (25/36)
江苏农业科学院畜 牧兽医研究所	范必勤等	波尔山羊	6	53	27	74.0 (20/27)
山东东营市 东营区畜牧局	赵国财等	波尔山羊	23	406	245	55.0 (?)
四川省畜牧科学院	李键等	波尔山羊	7	142	44	65.9 (29/44)
西北农林科技大学 奶牛胚胎移植站	高志敏等	波尔山羊	13	139	89	56.18 (50/89)

表 15 国内羊胚移数目在千枚以上的报道统计表

单位 (年度)	品种	供体数 (头)	获可用胚 (枚)	妊娠率 (%)
内蒙古自治区家畜改良工 站 (1991~1996)	绵羊	408	4002	?
内蒙古自治区畜牧科学院 (1996~1998)	白绒山羊	306	3782	64.99 (1409/2165)
新疆畜牧科学院 (1999)	山羊	90	1086	?
香港屹昌科技集团和美国 CCI 集团 (1999~2000)	多赛特和陶赛 克绵羊	?	12000	?

? 表示没有相关数据或数据不准确

尽管这些数据不全，但可以看出，国内羊的胚胎移植技术已比较成熟。据报道，近两年来国内山羊、绵羊的胚胎移植数每年在 3 万枚以上，使国内种羊数目迅速扩大，为杂交改良打下了基础^[53]。虽然羊的胚胎移植操作直观，但是受繁殖季节的限制，而且手术有粘连等问题，限制了羊胚胎移植的商业化。不过近年纯种肉用山羊、绵羊的价格较高，使得国内羊的胚胎移植发展很快，其超排效果有较大的提高。如 2000 年，窦忠英等在杨凌金坤生物工程股份有限公司，1 只波尔山羊 1 次采可用胚 46 枚。2001 年窦忠英等在河南禹州澳豫农牧公司进行波尔山羊的胚胎移植中，每头供体平均获可用胚 22.8 ± 2.7 枚 ($n=36$)，在国际上处于领先水平^[55]。同年在周至绿色世纪公司 1 只波尔山羊采胚移植后得到 21 只羔羊（未公开发表资料）。

我国的养殖业，特别是牛，以役用为主，改良牛的比例只占 30%，牛的生产性能很低，远远不能满足人们生活水平以及现代化农业发展的需要。在乌鲁木齐参加中国首届动物胚胎生物技术学术研讨会的专家认为，我国家畜胚胎移植技术，尤其是牛的胚胎移植技术发展很快，已基本具备产业化条件，发展前景广阔^[14]。我国是养牛大国，1998 年末存栏数达 1.24 亿头，居世界第三位。但牛肉和牛奶产量仅 479.9 万吨和 662.1 万吨，人均不到 4 公斤和 5 公斤，分别仅为世界人均水平的十二

分之一和十六分之一^[12]。钱宏光认为当前我国肉羊业存在的问题包括以下几个方面：(1) 缺乏专门的肉羊品种，优良品种数量与需求存在较大矛盾；(2) 品种利用混乱，缺乏长远规划，导致不应当的品种炒作，假冒伪劣、以次充好现象时有发生；

(3) 科研工作滞后于生产，阻碍了该产业的全面稳定发展；(4) 规模化、产业化的肉羊场尚未建立，影响了科研成果和实用技术的应用；(5) 肉羊生产水平尚低，如个体胴体重小（1997年统计资料：中国 13.5kg、世界 15kg、美国 30kg、澳大利亚 30kg、新西兰 16kg）。可以看出未来几年、几十年，中国养羊业存在着巨大的发展空间，已正式成为一个黄金产业^[24]。优良品种羊价格居高不下，如在第二届河南省种羊竞价展销会上（2002.10.14）一只 1.3 岁的公羊买到 8.6 万元的天价^[53]。作为能够快速扩繁的胚胎移植技术开始得到越来越多人的重视，2001 年和 2002 年国内羊和牛的胚胎移植应用规模空前，特别是波尔山羊胚胎移植数量很大，许多省份都开展了此项工作。

§ 2 牛、羊同期发情技术的研究进展

同期发情技术作为胚胎移植的配套技术，在生产上有着重要的实用价值。如牛的发情周期平均为 21 天，假如不用同期发情处理，一周内会有 33%（7/21）的牛发情，受胎率（conception rate）大约为 65%—70%，那么妊娠率（pregnancy rate）为 $33\% \times 65\% = 21\%$ ；同期发情处理会有 75%—90% 的牛发情，受胎率以 65% 计算，那么妊娠率至少为 $75\% \times 65\% = 49\%$ （见图 2）。同期发情的优点主要有：(1) 促进人工授精（AI）技术广泛迅速地应用；(2) 提高家畜繁殖力，缩短产犊间隔；(3) 节约人力、物力、时间，方便配种工作；(4) 方便管理；(5) 作为胚胎移植技术的重要环节，可提高胚胎移植效益。当然同期发情技术也存在缺点，主要包括：①增加了成本；②需要有技术的劳动力；③增加了短期的管理强度^[27]。

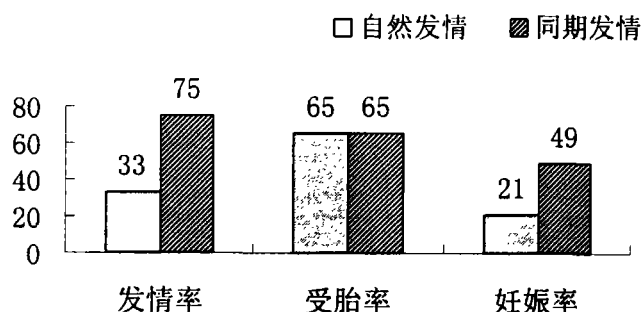


图 2 在一周时间内应用同期发情技术处理对牛繁殖性能的影响

§ 2.1 同期发情技术中的相关激素

2.1.1 孕激素

由母畜黄体分泌的孕激素为孕酮，1934 年获得了孕酮的结晶^[2]。孕激素的种类很多，可以人工合成。合成的孕激素按其化学结构又分为两类衍生物，即孕酮类衍生物和甾丸酮类衍生物。孕酮类衍生物包括：氯地孕酮、己酸孕酮、甲孕酮、甲地孕酮等。甾丸酮类衍生物包括：炔诺酮、醋炔诺酮、18-甲基炔诺酮等。以上各种成分

均以孕激素活性为主,具有一定的抑制排卵作用。孕酮内服经肠粘膜和肝脏迅速破坏,但合成的孕激素如炔醇酮和醋酸羟甲基甲孕酮(MGA)等可以口服。采用孕激素抑制母畜发情,起到延长发情周期推迟发情期的作用,为引起下一个发情周期创造一个共同的起点。孕激素类为主的同期发情产品包括口服、注射、皮下埋植或阴道放置等。由于孕酮半衰期只有20多分钟,口服及注射需每天给药,现常用阴道栓法(国外肉牛常用口服法)。因为这两种方法使用方便、效果可靠、成本低廉。现认为孕激素对动物发情和排卵的作用主要为:少量孕酮能与雌激素共同作用使母畜出现外部发情表现,并接受交配。家畜排卵前的成熟卵泡能产生少量孕酮,与卵泡分泌的雌激素协同起来,能促进LH的释放而刺激排卵。大量孕酮通过对下丘脑或丘脑前叶的负反馈作用,抑制垂体FSH和LH的释放,特别是FSH的释放,使卵泡不能生长至排卵时的大小,动物的发情被抑制^[2]。

2.1.2 前列腺素

天然的前列腺素存在于家畜的各种重要组织中,种类很多。1930年发现了前列腺素,直到1957年才提取出纯品,并阐明了化学结构,已经发现者可以归纳为三类九型(根据环外双键数目不同分为PG1、PG2、PG3三类,又根据环上结构的不同分为A、B、C……I九型),人工合成者已达到一千多种。由于这类药的作用很多,用途很广,故上个世纪60年代受到医学界的极大重视。70年代逐渐进入畜牧领域,在家畜繁殖方面显示出重要性,PGF₂。在外周血中的半衰期仅有20多秒钟,而其代谢产物15-酮-13,14-双氢-PGF₂。的半衰期为8分钟。如给牛肌注25mgPGF₂.,在48h内有90%以上通过尿液被排泄^[30]。目前常用的具有强烈溶黄体作用的制剂为氯前列烯醇。

2.1.3 促性腺激素释放激素

天然的促性腺激素释放激素(GnRH)主要由下丘脑合成,它对生殖过程的神经内分泌调控起着中心作用。上个世纪60年代合成了天然的10肽化合物和大量具有不同活性的GnRH类似物。GnRH以脉冲方式分泌进入下丘脑垂体门脉系统,调控垂体对FSH/LH的合成。它以神经分泌方式从神经末梢释出,分泌到垂体门静脉血中的GnRH可调节FSH/LH的分泌,这种脉冲式释放可以选择性调节其中的一种激素释放^[111]。其脉冲幅度和频率对垂体反应的大小很重要。另外,GnRH对垂体有“自身预备作用”,即反复注射GnRH,可导致LH反应幅度越来越高,而对FSH则无作用。同时,GnRH具有调节促性腺激素合成量和释放量的作用,最终引起排卵^[36]。GnRH不论采用滴鼻、注射或阴道内给药均可,但剂量因给药方式而不同。如滴鼻或阴道内给药时剂量较大,一般为毫克水平;静脉、肌肉和皮下注射时,剂量较小,一般为纳克和微克水平。

2.1.4 雌激素

母畜的雌激素(E₂)主要由发育卵泡的内膜细胞和颗粒细胞产生,其次卵巢间

质细胞、黄体和胎盘也能产生一定量的雌激素。1935年,从孕马尿中得到了雌二醇结晶。天然的雌激素主要包括 17β -E₂、E₁ 和 E₃, 其中的 17β -E₂ 生物活性最强。人工合成的雌激素主要有己烯雌酚、己雌酚、苯甲酸雌二醇等。母畜的 E₂ 具有周期性分泌的特点^[2]。在发情周期中, E₂ 的增加与消失往往与孕酮呈负相关。对牛, E₂ 的周期性变化与卵巢上卵泡的变化相一致。E₂ 的主要作用是刺激中枢, 使母畜表现发情。但在周期的不同时间, 其作用具有明显的特点—正负反馈作用。当 E₂ 减少到一定量时, 可借正反馈作用, 通过丘脑下部或垂体前叶, 引起 FSH 释放, 促进卵泡发育。排卵前 E₂ 明显升高, 则反过来作用于丘脑下部或垂体前叶, 抑制 FSH 分泌。但通过正反馈促进下丘脑 GnRH 的释放, 导致 LH 峰的出现, 引起排卵发生^[128]。

§ 2.2 牛同期发情技术的研究状况

近年来, 牛同期发情技术的研究很多, 且都取得了较好的同期发情效果。现将这些报道总结如下, 以利于理解和比较它们的差异。

表 16 牛同期发情方案的汇总与效果比较

序号	名 称	方 案	效 果
1	MGA 方案 ^[106] (MGA System)	口服, 每天每头牛 0.5mg MGA, 连续 14 天。停药后 2~6 天发情。发情后 8—12 小时配种。	一个情期妊娠率达到 20%—30%
2	MGA-PGF 方案 ^[106] (MGA-PGF System)	每天每头牛添加 0.5mg MGA, 连续 14 天。第 31 天 (或 33 天) 注射一次 PG, 发情后 8—12 小时配种。	一个情期妊娠率达到 68%
3	MGA-Selectsynch 长方案 (Long-term MGA-Select) ^[105]	每天每头牛 0.5mg MGA, 连续 14 天。第 26 天注射 GnRH, 第 33 天注射 PGF, 72 h、80 h 后配种, 或连续观察 5 天, 发情后 8-12 小时配种。	一个情期妊娠率达到 70%
4	MGA-Selectsynch 短方案 (Short-term MGA-Select) ^[71]	第 0 天注射 GnRH, 第 1—6 天每头牛每天 0.5mg MGA, 第 7 天注射 PGF, 60 h、72 h 后配种, 或连续观察 5 天, 发情后 8-12 小时配种。	一个情期妊娠率达到 50%—70%
5	PGF 方案 ^[69] (Single PGF Protocol)	肌注 PG 一次 (或两次, 间隔 12 h), 理论上 有 2/3 的牛发情。连续观察 5 天, 发情后 8-12 小时配种。	一个情期妊娠率达到 42%
6	二次 PGF 方案 ^[70] (Two-shot PGF Protocol)	间隔 11 天两次注射 PGF。连续观察 5 天, 发情后 8-12 小时配种。	一个情期妊娠率达到 62%
7	同期化排卵程序 ^[112] (Ovsynch Program)	第 0 天注射 GnRH, 第 7 天注射 PGF, 第 9 天注射 GnRH, 8 h、18 h 后配种 (固定时间)。	一个情期妊娠率达到 50%—70%
8	改进程序 ^[112] (Heatsynch Program)	第 0 天注射 GnRH, 第 7 天注射 PGF, 第 9 天注射 ECP (estradiol cypionate), 48 h 后配种 (固定时间), 或不注射 ECP, 观察发情, 发情后 8-12 小时配种。	一个情期妊娠率达到 51%
9	改进程序 ^[112] (Cosynch Program)	第 0 天注射 GnRH, 第 7 天下午注射 PGF, 第 10 天早上配种, 或注射 GnRH 18 h 后配种 (固定时间)。	一个情期妊娠率达到 48%
10	改进程序 ^[78] (Select Synch Program)	第 0 天注射 GnRH, 第 7 天注射 PGF, 观察发情, 发情后 8-12 小时配种。	一个情期妊娠率达到 55%
11	改进程序 ^[90] (PG+CIDR Program)	第 0 天放 CIDR, 第 6 天早注射 PGF, 第 7 天下午去栓。48 h、54 h 后配种; 或观察发情, 发情后 8-12 小时配种。	一个情期妊娠率达到 59%

表 16 是牛同期发情方案的汇总与效果比较, 在表中没有指明药物的剂量及名称, 原因是相关商品的名称较多, 且在不同的文献中标示单位不同, 若需要可查阅参考文献^[69, 70, 71, 78, 90, 105, 106]。每一种方案都是根据反刍动物的发情周期与激素作用的特点而设计的。表中的妊娠率仅说明方案是可以取得令人满意的效果, 但不存在可比性, 因为每种方案的实验条件不同。表 17 是各种方案的汇总与说明, 主要从机理、实用范围以及注意事项方面对这些方案作一说明, 以便于理解。

表 17 牛同期发情方案的汇总与说明

序号	名称	原理	适用范围	注意事项
1	MGA 方案 ^[106] (MGA System)	MGA 是醋酸羟甲基孕酮, 具有抑制母畜发情的作用。通过人为地延长了黄体期, 为下次发情创造了一个共同的起点。	肉牛和奶牛的育成牛效果较好; 产后奶牛效果不稳定。	MGA 处理时间较长, 使得某些个体卵泡中卵母细胞成熟受到抑制或发生异常, 使停药后第一次发情配种妊娠率低, 故常在下次发情时配种。很少单独使用。
2	MGA-PGF 方案 ^[106] (MGA-PGF System)	MGA 处理使母畜有近似的发情周期起点, 再用 PGF 处理得到良好同期效果。	肉牛、奶牛效果均好。	MGA 口服, 添加一定要混匀, 以保证每头牛都能得到足够的量。
3	MGA-Selectsynch 长方案 (Long-term MGA-Select) ^[105]	将 MGA 方案与同期化排卵程序结合起来应用。	产后肉牛的首选程序, 对不发情的牛也有较好的效果。	在处理过程中, 发情的牛不要配种。可以“固定时间的人工输精 (Fixed-time AI) ”。
4	MGA-Selectsynch 短方案 (Short-term MGA-Select) ^[71]	将 MGA 方案与同期化排卵程序结合起来应用。	处理时间短。	与 Selectsynch 方案比, 有一个相同或略高的妊娠率。可以“Fixed-time AI”。
5	PGF 方案 (Single PGF Protocol) ^[69]	PGF 是溶黄体因子。其溶解机理复杂。黄体溶解后, 卵泡发育的抑制被解除。卵泡迅速生长至排卵大小。	对没有黄体的牛无效 (包括处于发情前期 5 天内的牛、育成牛、产后不发情的牛)。	成本低, 但仅对周期 6-17 天的牛有效。对产后肉牛不推荐使用, 因为产后 50% 的带犊肉牛在早期不发情。不推荐用于“Fixed-time AI”。
6	二次 PGF 方案 (Two-shot PGF Protocol) ^[70]	间隔 11 天处理, 可以使第二次处理时, 家畜处于周期 (0+11) 天与 (6+11) 天, 存在功能性黄体。	对不发情的牛无效。	易操作, 成本低, 但发情不够集中。现改进的报道有两种认为间隔 12 天或 14 天效果较好。不推荐用于“Fixed-time AI”。
7	同期化排卵程序 ^[112] (Ovsynch Program)	注射 GnRH 能诱导 LH 峰和 FSH 峰的出现。LH 峰出现可以使大卵泡排卵和黄体化。GnRH 处理后 7 天出现功能性优势卵泡。	周期正常的泌乳奶牛和肉牛。	严格按照程序执行; 可能出现排卵不发情现象; 可以“Fixed-time AI”。
8	改进程序 ^[112] (Heatsynch Program)	用 E ₂ 代替 Ovsynch 程序中的第 2 次 GnRH 注射, 可以提高母畜的发情率。	肉牛及奶牛育成牛。	成本比 Ovsynch 低; 可能出现发情不排卵现象; 可以“Fixed-time AI”。
9	改进程序 ^[112] (Cosynch Program)	同 Ovsynch 程序。	周期正常的泌乳奶牛和肉牛。	可以注射 GnRH 或不注射, 两种选择均可“Fixed-time AI”。
10	改进程序 ^[78] (Select Synch Program)	同 Ovsynch 程序。	周期正常的泌乳奶牛和肉牛。	不注射 GnRH, 需发情观察; 可以“Fixed-time AI”。
11	改进程序 ^[90] (PG+CIDR Program)	将孕酮处理与 PG 处理结合起来应用。	周期正常的泌乳奶牛和肉牛。	CIDR 处理易污染; 对不发情的牛也有效果, 但没有理论依据。可以“Fixed-time AI”。

在这些方案中同期化排卵 (Ovsynch) 程序及其改进程序是近些年来研究较多的同期发情程序。Ovsynch 程序是：注射 GnRH 的时间记为 0 天，第 7 天注射 PGF，第 9 天注射 GnRH，注射 GnRH 后 8-18 h 后配种。它可以提高排卵的同期化程度和实现“定时的人工输精 (Fixed-time AI)”，且在泌乳母牛的应用上得到了较好的妊娠率^[116]。Martinez 等人研究了在注射 GnRH 后，第一个卵泡波的优势卵泡排卵之后（排卵记为 0 天）的第 3 天、第 6 天和第 9 天诱导肉牛卵泡波出现的能力，发现只有那些对处理发生反应的母牛可以诱导出现新的卵泡波。并且在处理后的第 7 天有 74% 的牛存在一个优势卵泡，其中 85% 的优势卵泡大于 9 mm 和有排卵能力。说明在 GnRH 处理后 7 天可以出现功能性优势卵泡^[95]。在 GnRH 处理后 7 天注射一次 PGF₂，与单一注射 PGF₂ 比较其发情同期化程度，结果提高了在注射 PGF₂ 后 2~3 天发情的同期化程度^[112]，而且两组实验的妊娠率没有区别。Pursley 等人证实注射 PGF₂ 之后 48h 注射 GnRH 可以诱导大约 30 h 后的排卵^[107]。这个程序对生产者而言，不需要发情鉴定，通过对卵泡和黄体发育的控制，可以及时准确地实施人工输精。从经济角度看，Ovsynch 程序可以增加每头牛的纯利润。以应用 P₄ 或 PGF₂ 控制黄体期长度为基础的同期发情程序在生产中已经应用了许多年，并取得了良好的效果。但是这些程序没有考虑开始处理时卵泡所处的发育阶段，因而会出现发情不够集中的现象。因此，通过使卵泡生长和黄体退化均同期化，可以实现动物集中发情，提高同期发情的效果。卵泡的发育是下丘脑—垂体—卵巢轴作用下的一个复杂生理过程。卵泡波从“出现期” (emergence, 又称为募集) 到“分离期” (deviation)，主要与血液循环中的 FSH 有关。随着卵泡的生长，FSH 浓度逐渐下降（由于抑制素和 E₂ 抑制），到卵泡生长至“分离期”时 FSH 浓度降到了最低点。在这时，LH 脉冲性释放可以促进卵泡的继续生长以及 E₂ 的产生。随着优势卵泡的生长，E₂ 分泌逐渐加强，当血液中有足够的 E₂ 来诱导出现 LH 峰时，引起了优势卵泡排卵^[128]

(见图 3)。卵泡生长的同期化

可用以下几种药物处理：P₄、E₂、P₄+E₂、GnRH 及其类似物^[71]。大剂量孕酮处理可以抑制 LH 的分泌从而引起优势卵泡的闭锁和卵泡波的更替 (turnover)；E₂ 单独处理，或者结合 P₄ 处理，可以引起卵泡波的更替；GnRH 或其激动剂 (Deslorelin) 能诱导 FSH 峰和 LH 峰的出现^[116]。LH 峰出现可以使在用激素处理时存在的

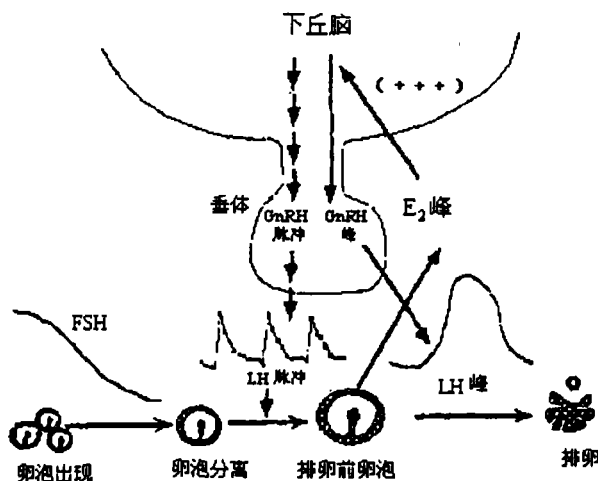


图 3. 优势卵泡从出现至排卵过程示意图

大卵泡排卵和黄体化^[91]。优势卵泡排卵后，内源性的 FSH 峰可以产生一个新的卵泡波。在美国和欧盟，类固醇激素禁用于泌乳奶牛，因此用 GnRH 及其激动剂作为调控卵泡发育的药物成为该项研究的首选。生产者必须严格遵守 Ovsynch 程序，假如在使用 GnRH 和 PGF_{2α} 时，注射的时间间隔小于 7 天，那么新生黄体对 PGF_{2α} 注射可能不反应；假如第二次注射 GnRH 的时间间隔大于 48h，那么会有许多的母牛在注射 GnRH 前发情。这样发情将变的不同步，定时的输精会变得不准确。而且这个程序的成功主要取决于母牛是否有正常的周期和开始处理时母牛所处的发情阶段。理想阶段是母牛处于发情周期的第 5-10 d。这是因为在发情周期早期（例如：第 2 或 3 d 处理），自发的排卵已经发生而潜在的优势卵泡太小（≤9mm），对注射 GnRH 的反应不足以诱导排卵^[98]，当第二次注射 GnRH 时，优势卵泡可能是老化的（优势化时间超过 5 天），这些老化的优势卵泡不发生排卵，即使排卵其卵母细胞也很少是可发育的，因此母牛在发情周期早期阶段应用 Ovsynch 程序会产生一个很低的妊娠率^[98]。在接近发情时处理（例如：第 15d），有两波周期的母牛一般会有一个小的优势卵泡，对 GnRH 处理没有反应，不能引起排卵，在注射 GnRH 2-4 天后，母牛子宫会自发地分泌 PGF_{2α} 引起黄体的退化。这样，在 GnRH 处理后 7 天注射 PGF_{2α} 时，母牛的黄体已经退化、甚至发情，在固定时间的人工输精之前即会排卵。因此，在应用 Ovsynch 程序时，通过预同期发情程序处理，使奶牛处于发情周期中的理想阶段可以提高 Ovsynch 程序的效果。有实验表明：随机开始处理的妊娠率为 36%；用预同期发情程序（间隔 14 天注射 2 次 PGF_{2α}）处理后第 12 天首次注射 GnRH，妊娠率为 48%（见图 4）。同期发情预处理会使在 Ovsynch 程序开始实施时，90% 的母牛处于发情周期的理想阶段，即 5-10 天。

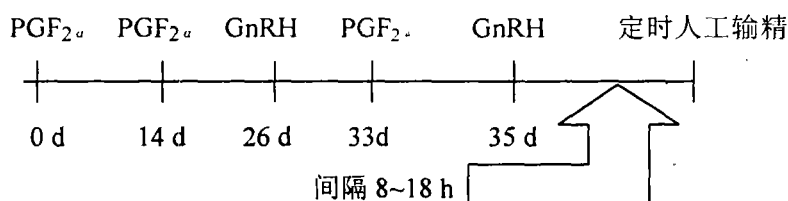


图 4 Ovsynch 程序改进程序

总之，对牛的同期发情程序人们已经进行了深入的研究。在生产应用中，要严格按照程序执行，才会取得良好的效果。但是提高饲养管理水平，最大限度地减少应激和疾病，是实现这一目标的先决条件。至于方案的优劣并不是绝对的，应根据自己牛场的实际情况选择合适的方案。

§ 2.3 羊同期发情技术的研究状况

羊的同期发情技术同牛的一样，随着生物工程技术的发展其重要性日益为人们所认识。绵羊的初情期为 6-8 月龄，发情周期平均为 17 天，变动范围为 14-20 天；产后第一次发情见于下一个发情季节；发情持续期为 24-30（15-35）小时。山羊的

初情期为 4-6 月龄, 发情周期平均为 20.6 天, 变动范围为 18-22 天; 发情持续期为 24-30 (15-35) 小时。同期发情即通过控制黄体期的长度和卵泡的发育来实现^[2]。反刍动物的卵泡发育是以波的形式进行的, 牛为 2-3 个卵泡波, 而绵羊和山羊则多具有 4 个卵泡波 (见表 18)^[35]。

表 18 反刍动物卵泡发育波及其特征

畜别	波数 (每个发情周期)	波持续时间 (d)	发情周期 (d)	优势卵泡直径 (mm)			
				波 1	波 2	波 3	波 4
牛	2	10	20	15	15		
	3	8	23	15	12	15	
	3	3.4—3.5	9—16	5—7	4—6	4—6	5—7
绵羊	4	3.4—3.5	16—17	5—7	4—6	4—6	5—7
	>4	3.4—3.5	22—24	5—7	4—6	4—6	5—7
山羊	4	3—4	23	9	7	7	10

自 Dutt 和 Casida (1948), Robinson 等 (1956) 开始用注射孕酮的方法进行绵羊同期发情处理后, Dziuk 和 Hincle (1964) 又相继采用口服、皮下埋植孕酮的方法, 但均未能在生产上大规模应用。Robinson (1965) 用孕酮阴道海绵栓的方法, 才使同期发情技术在生产上大规模应用得以实现^[32]。进入 70 年代, Douglas 和 Ginther 等 (1973) 首先用前列腺素类似物对家畜进行肌肉注射、皮下注射和子宫颈灌注, 获得了理想的同期发情效果^[73]。Boland 等 (1978) 将 PMSG 用于前列腺素同期发情处理程序中, 也取得了肯定的试验结果^[65]。Mcklvey (1994) 认为前列腺素及其类似物是同期发情处理的首选药物, 因为其价格较低且具有广泛的适用性; 而且还认为 PMSG 所产生的同期发情效果不如 FSH, 其受精率较低^[96]。但 Mukerjee (1992) 却认为 PMSG 处理的山羊比用 FSH 处理的山羊具有更高的受精率和胚胎回收率^[99]。张一玲等 (1988) 在非繁殖季节用 18-甲基炔诺酮处理母羊, 并配合注射 PMSG, 可使山羊同期发情率达 97.6%^[47]。李裕强等 (1997) 在奶山羊上用前列腺素诱导发情, 认为在情期的 8-16d 内效果确切^[19]。目前绵羊和山羊的同期发情处理方法有: ①PGF₂ 处理法; ②孕激素处理法; ③孕酮+PMSG 处理法; ④孕酮+PGF₂ 处理法; ⑤PMSG 处理法等。张一玲等 (1993) 报道, 采用 PMSG、PMSG+孕酮处理不仅可使羊发情同期化, 还具有提高双羔率的作用。其方法为: 将孕酮埋植管 (含孕酮 60mg) 植于羊耳背皮下, 6 d 后取出, 同时肌注 PMSG 500IU, 其后注意观察并放入试情公羊试情, 对发情羊立即进行人工授精^[46]。可以看出羊的同期发情技术中, 未见“同期化排卵”研究报道, 这或许与羊的卵泡波持续时间较短有关。

§ 3 牛、羊超数排卵技术的研究进展

§ 3.1 牛超数排卵技术的研究进展

牛是单胎动物，产犊数量少，因而一直都很重视对母牛超数排卵的研究。但是母牛个体间大的超排反应差异使得人们在生产实践中无法准确预测其超排效果，这样大大影响了胚胎移植的效益。目前大量使用的超排程序是上个世纪 80 年代初成型推广的，20 多年来没有大的改进^[56]。

3.1.1 常规的超排程序

牛超排用过的促性腺激素有三类：FSH、PMSG、hMG（人停经促性腺激素）。现在最常用的是 FSH，而 PMSG 和 hMG 很少用，因为 PMSG 在牛体内的半衰期太长（40h 左右），hMG 的价格太贵且仅有少数文献报道其效果好。常用的超排方案大同小异，一般为以递减剂量每天两次注射 FSH，连续注射 3~5 天（因为未使用缓释剂的情况下，FSH 在牛体内的半衰期为 5 小时以下）；或一次 PMSG（也可配合 APMSG）注射^[94]。

3.1.2 改进的超排程序

陈静波等报道，在供体牛超排注射的第 5 天早再注射 FSH 0.2~0.5mg，其它处理与常规 4 天 8 次注射相同。结果改进方案与常规方法的可用胚数分别为 7.79 枚和 5.58 枚，显著改进了超排效果。其分析原因为：在超排的第五天早（供体即将发情）再次注射 FSH，支持了卵泡的充分发育和成熟，使一些发情较晚的供体母牛不会因促卵泡素不足而使卵泡退化，故显著改善了超排效果（见图 5）^[3]。

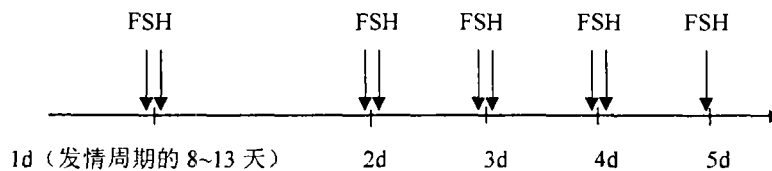


图 5 改进的超排程序

Moreira 和 Thatcher 等报道用牛生长激素（bST, bovine somatotropin, Posilac）处理超排母牛，可以促进超排效果的提高，其原因可能是 bST 提高了受精率或者增强了早期胚胎的发育能力^[97,116]。因而结合同期发情程序、超数排卵程序与 bST 的作用改进设计出如下程序，见图 6。

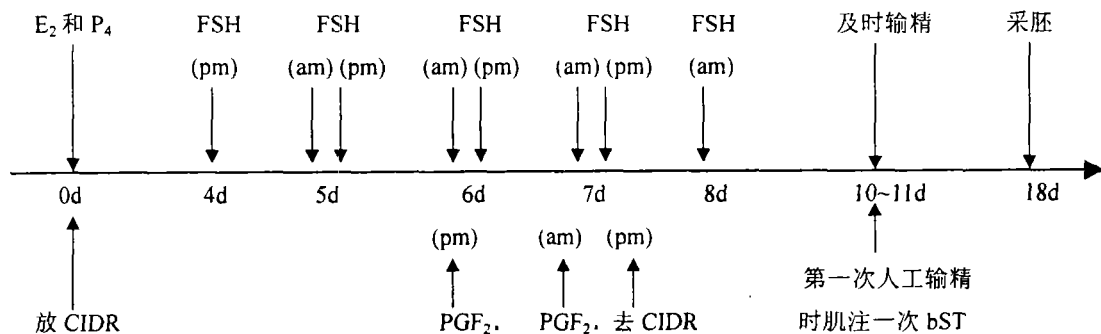


图 6 改进的超排程序

§ 3.2 羊超数排卵技术的研究进展

羊的常规超排方案是：山羊在发情周期的第 8、9 或 10 天，绵羊在发情周期的第 11、12 或 13 天，以递减剂量每天 2 次注射促卵泡素（FSH），连续注射 3~4d，总剂量在 300~400IU，有报道认为绵羊激素用量比山羊低，总剂量在 150~300IU^[21]。

3.2.1 常规的超排程序

羊超排用过的促性腺激素种类有 FSH、LH、PMSG 等。现在常用的是 FSH。报道的超排程序有以下几种：①FSH 法：在发情周期的第 8d-12d 开始肌注 FSH，每天 2 次，连续 3d，剂量 7.5mg—10mg。②FSH+LH 法：在发情周期的第 12d，开始肌注 FSH，每天 2 次，连续 3d，总剂量为 7.5mg—11.5mg；发情配种时肌注 LRH—A₃ 60 μg/只或 LH 200IU/只。③PMSG+LH 法：在发情周期的第 13d 一次肌注 PMSG 1000IU/只，48h 后试情，发情配种时注射 LRH—A₃ 60 μg/只^[39]。④PMSG+APMSG：在发情周期第 13 天一次肌注 PMSG 1000IU/只，发情后 12h 给予 APMSG，可显著改善 PMSG 超排效果^[103]。⑤P₄+FSH+PG：发情周期的任一天放栓（连续 10d-12d），从去栓前 3d 开始按减量法肌注 FSH，每天 2 次，总剂量 7.5mg；第 5 次注射 FSH 时去栓^[32]。

3.2.2 改进的超排程序

Jabbour 等报道，在绵羊一次高剂量 FSH（15mg）注射配合低剂量 PMSG（300IU）注射可以取得满意的超排和胚胎回收效果。在山羊上也取得了类似结果^[77,86]。

王希朝等用 300g/L PVP（聚乙烯吡咯烷酮）溶解 FSH 300IU/只，每只羊获可用胚 13.8 枚（n=4），与对照组（8 次 FSH 注射）获可用胚 9.8 枚（n=4），二者经 t 检验差异不显著。但是简化了操作程序，且在一定程度上具有提高山羊超数排卵的作用。

§ 4 牛、羊同期发情与超数排卵技术的优化思路

作为胚胎移植的两个关键技术，同期发情与超数排卵效果如何提高，能否从程序上优化，是人们关心和研究的重点。从国际胚胎移植协会（IETS）的报道可以看出最近十年来每头供体牛获得的可用胚胎数平均在 6 枚左右，羊获得的可用胚胎数平均在 10 枚左右，说明超数排卵技术基本稳定^[39]。下面对其优化思路作一论述。

§ 4.1 牛同期发情与超数排卵技术的优化

4.1.1 牛同期发情技术的改进思路

牛同期发情技术前面已经作了详细的论述。目前改进同期发情的实验报道很多，效果都不错。但良好的同期发情效果的获得必须以健康的家畜和正确的同期发情程序为基础。因此，关键是技术在生产中的应用问题，即如何协调好每一个环节。

在程序上,应从众多的程序中选出适合自己牛场的程序。

4.1.2 牛超数排卵技术的改进思路

近年来,随着超声成像技术的发展,对卵巢进行超声扫描使得人们对动物个体间的超排反应差异的原因有了更深一步的认识,不断尝试寻找预测超排效果的标准或简单实用的方法。此外,研究者也从激素、程序、饲管等方面进行了大量的试验。这些研究的目的是为了提⾼卵泡波发育的同期化程度,提⾼超排的卵泡数和排卵率及胚胎的可用率^[37]。

① 主动增加用以超排的卵泡数

这种设想主要是通过刺激早期有腔卵泡和腔前卵泡数量来增加反应的卵泡数,使得在开始超排处理时有更多较大的、反应能力一致的卵泡存在。牛的初级卵泡贮库是在胎儿时期建立起来的,该贮库建立之后,卵泡就逐渐地和持续地离开该贮库而继续生长,一生中其总数只会减少。母犊出生时大约有 68 000 个原始卵泡,而在母牛一生中能发生排卵的卵泡数只有几十个,其余的均发生闭锁和退化。因而如何有效地增加用以超排的卵泡数,是进一步发掘卵巢潜能的手段之一。以往的研究发现,对外源性激素反应不好的母牛有两类:第一类牛每个卵巢只含有 50~200 个生长卵泡(直径在 0.7 mm 以上),而反应好的牛卵巢的生长卵泡数则在 600 个以上^[94]。因此造成超排反应差异的原因之一可能是动物遗传或生理状况不同。改善这种类型母牛超排效果的方法之一是设法促使更多的卵泡变为有腔卵泡。Cushman RA 等人研究发现通过长期使用 bST 和 E₂ 可以增加有腔卵泡数目和改善超排效果^[67]。

② 延长排卵前卵泡的发育来增加排卵数

研究发现,当母牛进行超排处理后有一个明显的变化是排卵前卵泡的发育期变短,从黄体退化到排卵前 LH 峰出现的时间间隔由 61 h 减少到 44 h^[63]。在超排反应中,并不是所有的卵泡可以同期化成熟和排卵。当发育较早的卵泡诱导 LH 峰出现时,还存在没有成熟的卵泡,这样导致了卵泡和卵母细胞发育的不同步性^[84]。通过延长排卵前卵泡的发育,从理论上讲可以减少卵泡发育的不同步性,并能使更多的卵泡获得对 LH 信号发生反应的能力。

现在延长排卵前卵泡发育的方法主要有以下 2 种:一是 Vos 等人报道通过使用外源性孕酮栓可以阻止排卵前的内源性 LH 峰的出现,在孕酮栓去除之后注射 GnRH,2 小时后可以诱导 LH 峰的出现^[126];二是 d' Occhio 等人报道使用 GnRH 激动剂处理牛,可以消除垂体分泌 GnRH 的作用,然后用纯化的 LH 处理可以人为地产生 LH 峰^[68]。Vande EE 等人采用第一种方法历时 3 年的研究结果表明:延长排卵前卵泡的发育时间增加了成熟卵泡的数量且提高了排卵率,但是最终可用胚的数目没有增加,其分

析认为这可能是由于外源性激素处理使得输卵管环境发生紊乱而导致胚胎的发育受到了不利的影响^[125]。目前,超数排卵主要应用于两个方面:一是为了获得用于移植的胚胎;另一是为了获得卵母细胞(活体采卵),进行体外生产胚胎。因而这一思路仍具有应用价值。

③ 小剂量 FSH 预处理

一些研究认为,在第一个卵泡波出现后的第 2 次 FSH 峰与下一个卵泡波(即开始超排处理时)中存在的对 FSH 敏感的 2~6mm 卵泡的群体大小有关^[56]。因此,在发情周期的初期用小剂量 FSH 对母牛进行预处理,使得更多的储备卵泡(腔前卵泡)变为有腔卵泡,可以提高周期 9~13 d 有腔卵泡的数量,从而改善超排效果。但是 Gray BW 等人发现用 FSH 预处理会导致在开始超排处理时卵巢上存在优势卵泡,而引起排卵数降低^[56]。目前没见到这方面的报道,可能是因为个体间的巨大差异,造成无法得到一个合适的处理时间和剂量来增加处理时有效的卵泡数目。

④ 抑制素主动免疫

卵巢颗粒细胞释放的抑制素(Inhibin, INH)可以选择性地作用于垂体抑制 FSH 的分泌。INH 是由 α 、 β 2 个亚基构成的异质二聚体,化学成分是糖蛋白,比较容易制成免疫原。用抑制素免疫动物后,内源性抑制素被抗体中和,血液中 FSH 浓度升高,达到增加排卵率的目的^[1]。研究表明,使用抑制素免疫后获得超排反应可以维持较长时间,而且使用较少剂量的 FSH 即可获得较好的超排效果,但也有相反的报道^[1]。因而如何用抑制素免疫来改善超排效果还需要进一步研究。

⑤ GnRH 及其类似物的应用

GnRH 是由 10 个氨基酸组成的肽类激素。它可以促使垂体释放 LH,提高奶牛多卵泡排卵的同期化程度。奶牛发情后(正常的非超排奶牛),血浆 LH 水平迅速上升,发情后 10 h 达到高峰,约 25 h 时排卵。超排奶牛发情后的 LH 水平低于非超排奶牛,而且超排母牛的排卵期较长,有的甚至长达 24 h^[56]。Wubiset 等人报道,超排牛在发情当天皮下注射 GnRH 250 μ g,结果可用胚数由 6.2 枚提高到 9.3 枚($P < 0.05$),受精率从 76%提高到 92%($P < 0.05$)^[56]。朱玉林等在试验牛静立发情后 6~8 h 第一次输精时肌注 LRH-A₂ 200 μ g,结果排卵数和获卵率比对照组均有所提高^[56]。此外,有报道认为 GnRH 还具有改善超排牛输卵管及子宫环境的作用,有利于胚胎的发育,促进子宫内膜的进一步成熟^[109]。但对超排牛注射 GnRH 的报道的观点并不一致。Mapletoft RJ 等人研究发现,在接近发情开始时给超排牛注射 GnRH(或者 17 β -E₂)并没有提高排卵率和改善胚胎质量^[94]。Kohram H 等人研究表明,在超排前 2 天注射 GnRH 200 μ g 可以增强卵巢反应能力和提高排卵率,但是可用胚胎数并没有增加^[89]。分析其原因认为,用 GnRH 处理的有利影响被未受精卵和退化胚胎数抵消了,

说明超排前短期给予 GnRH 可能阻碍了胚胎的发育。这些试验结果的不一致说明, 用 GnRH 来改善超排反应可能仅对一部分个体有效。

⑥ 控制卵泡发育波

前面的几种设想均是改变卵泡的发育波, 使其在超排处理时出现尽可能多的 2-6 mm 的卵泡数。而把用 FSH 处理安排在最佳时间, 人为地控制同期化卵泡的出现, 也是改善超排效果的重要方法之一。目前控制同期化卵泡波出现的方法是, 使用特定的激素处理或者通过去除大卵泡的方法获得。

在激素处理方法中, $17\beta\text{-E}_2$ 和 P_4 的联合使用比较成功。目前的研究表明, $17\beta\text{-E}_2 + \text{P}_4$ 会抑制优势卵泡的生长, 并且在 $(4.3 \pm 0.1) \text{ d}$ 产生一个新的卵泡波, 用这种方法处理, 可以在 4d 后开始注射 FSH, 结果与在发情后 8-12 天出现第二个卵泡波时处理获得的胚胎数没有区别, 但明显可以缩短时间间隔^[64]。在用超声引导除去 2 个大卵泡与除去所有直径大于 5 mm 的卵泡效果也一样。Baracaldo 等人分析认为, 应用物理方法处理(超声引导除去优势卵泡)优于激素处理, 因为激素处理引起大卵泡闭锁的同时也影响了下一个卵泡发育波中卵泡的发育^[60]。

§ 4.2 羊同期发情与超数排卵技术的优化思路

羊同期发情技术同牛的一样, 良好的同期发情与超数排卵效果的获得必须以健康的家畜和正确的同期发情和超数排卵程序为基础。因为羊的个体较小, 许多研究必须通过手术方法才能获得。羊的超排效果与品种关系很大, 如波尔山羊的超排效果优于安哥拉山羊和美利奴羊。另外从目前的报道可以看出, 同品种的供体因地域不同, 超排处理时对程序中激素量的要求也不同, 但笔者认为这种说法没有理论依据。现在主要的改进思路是能否进一步明确程序中激素的作用, 从而找出优化的方法。

4.2.1 羊同期发情的改进思路

羊的同期发情技术的改进有赖于对生殖激素与因子的新认识和发现。在生产实践中, 即使同一处理程序, 受体与供体羊的同期化效果常常会随着场家、环境、饲管水平、气候的不同出现不同的结果。因此, 需要在实践中总结提高, 这一方面应当有更多的交流。

4.2.2 羊超数排卵技术的改进思路

有报道认为羊的超数排卵结果以单侧卵巢排卵 10 枚较为理想。目前某些品种已达到这个目标, 如波尔山羊。而一些品种的超排反应, 每侧只有 4—5 枚, 这些超排结果是否与其生物学属性有关, 能否有大的提高还不清楚。目前的改进思路为优化超排程序和饲养管理模式。在优化程序方面, 有两个思路: (1) 延长排卵前卵

泡的发育来增加排卵数；(2) 控制卵泡发育波。此外，应在实践中不断地改进和优化程序，这样才能实现理想的超排效果。

§5 目前同期发情与超数排卵研究的热点与难点

§5.1 目前研究的热点

5.1.1 超数排卵前对超排效果的预测

这方面主要是指牛的超排。在许多商业性的胚胎移植记录中，可以看出母牛对超排的反应变异范围很大，使得在生产实践中无法预测母牛个体的超排反应，以至于许多研究者认为超排反应是无法预测的，这方面有许多探索性研究。Mapletoft RJ 等人总结以往的胚移记录发现，每个供体母牛的排卵率和可用胚胎数是相对稳定的，一次处理反应好的牛以后各次处理反应都好，而一次处理反应不好的母牛往往在以后处理时的反应也都不好^[94]。Tonhati H 等人统计了 2 941 头母牛的 5 387 次超排反应，认为超排反应不具有遗传性^[24]。因此，可以用上一次超排的结果来预测下一次超排反应，而不能依据遗传特性推测。Driancourt MA 的研究表明，母牛卵巢对超排处理的反应依赖于超排时存在的对促性腺激素敏感的卵泡数量，也就是说在用促性腺激素处理时母牛卵泡波所处的阶段对超排有重要的影响^[74]。随着超声成像技术的应用，人们希望统计出一个合理的标准，通过卵巢上黄体 and 卵泡的形态，来实现对超排效果的预测。在牛的一个发情周期中，有 2 或 3 个卵泡发育波。每一个波的特征是出现几个小卵泡，最终选择一个优势化卵泡。第一卵泡波的优势卵泡从出现（可以用超声检测到）至第 4 天生长较慢，在 4~6 天呈线性增长，然后发生闭锁^[114]。优势卵泡抑制同一波中其他卵泡的生长发育，并延迟下一个波的开始。卵泡内雌激素（ E_2 ）、孕酮（ P_4 ）、睾酮（T）和抑制素（INH）随卵泡大小、闭锁程度和发情阶段而改变。排卵前期，高的卵泡内 P_4 浓度是卵泡退化的标志，而卵泡的退化必然伴随 E_2 合成能力的减弱。Ali A 等人通过超声扫描技术确定卵泡的形态（卵泡直径 <4 mm 为小卵泡，4~9 mm 为中等卵泡， ≥ 10 mm 为大卵泡），通过抽吸卵泡的卵泡液并测定其中 E_2 / P_4 的比例来区别生长卵泡和闭锁卵泡，通过注射前列腺素（ $PGF_{2\alpha}$ ），诱导黄体退化来促使优势卵泡的排卵来评估卵巢的功能^[58]。研究结果表明：卵泡在出现后的前 2 天或者在出现后的 6 天以后（处于退化阶段），其形态（大小）和功能是一致的；当优势卵泡处在生长期 4~6 天时，一部分卵泡是生长的，而另一部分是闭锁的，其形态和功能似乎没有联系。这项研究说明，超排只能挽救那些处于生长期的中小卵泡，使其同优势卵泡一样生长到排卵时的体积。Kohram H 等人进行了 102 次超排试验来研究超排前卵泡状况与超排效果之间的关系：若在超排处理开始时存在一个处于生长阶段的优势卵泡（直径大于 7 mm）会严重减弱超排

反应;若仅存在大量4~6 mm的卵泡而不存在有功能性的大卵泡,则可以得到良好的超排效果^[89]。这些研究表明,应用超声技术来预测超排效果是一个有希望的辅助手段。在处理前对供体母牛进行分类,对卵巢反应好的母牛进行常规超排;对不排卵的母牛进行活体采卵(OPU);对卵巢反应不好的母牛可以用E₂和bST长期联合处理(3个月以上)后再行超排^[79,97]。此外,超排处理时,供体母牛孕酮水平与卵巢反应密切相关。当供体血浆孕酮含量在0.3mg/mL以上时,可以获得较好的超排效果。吴铁荣依据超排前母牛黄体的状态与超排效果相关,认为A、B级黄体的供体母牛超排效果较好^[34]。但亦有报道认为超排反应良好的母牛血浆中孕酮浓度为0.65~1.1mg/mL,仅依照黄体状态选择供体牛并不准确^[80]。对于羊的超排预测,理论上与牛相同,即同一供体的排卵率和可用胚是相对稳定的,其它方面报道很少。总之,目前对超排效果的预测还只是停留在经验水平上,准确地预测超排反应还需要进一步的研究。

5.1.2 影响超数排卵效果的因素

要提高超排效果,很重要的一点是进一步明确有利于超排效果提高的因素。这方面的研究报道较多,现总结如下。牛:①胎次:2~6胎较好;②超排季节:春夏秋冬均可,但冬季比夏季效果好;③促卵泡素剂量:常规剂量较好;④泌乳状况:非泌乳牛比泌乳牛超排效果好;⑤产后间隔:一般认为在60 d以上较好,这时母牛生殖器官和机能已恢复,开始超排即可,若供体母牛的子宫环境和机能未完全恢复,则获可用胚比例较低;⑥输精次数和输精量:一般输2次,每次使用2~3支精液即可;⑦超排处理次数:超排处理次数对胚胎的回收数没有显著影响,但超排处理会延迟配种受胎的时间,增加了母牛的空怀天数;⑧营养状况:研究表明过多的能量摄入会减弱超排反应,减少胚胎产量和改变胚胎发育过程中某些基因的表达。高浓度的精料摄入对胚胎生产的质和量都不利,而超排前和超排期间正常能量摄入可以产生更多的卵泡和提高胚胎的质量;⑨环境:这是一个很重要的因素,提供最好的环境条件,最大程度地减少应激,尽可能提供舒适的条件和保持一个好的健康体系是取得良好超排效果的基本保障。羊的报道有以下几个方面:①促性腺激素的种类、批号;开始超排日期;给药持续时间及总量;②供体状况(如年龄、处理次数)与超排效果的关系;③供体配种方式、冲胚方法与超排效果的关系;④供体卵巢状况(黄体色泽、数量与卵泡数及大小)与超排效果的关系;⑤胚胎发育阶段、质量与妊娠率的关系,一般认为囊胚优于桑椹胚;⑥受体卵巢状况(黄体色泽、数量与卵泡数及大小)与妊娠率的关系,一般认为只要存在正常黄体即可;⑦移植方法(单、双侧)、移胚数量与妊娠率的关系;⑧季节和营养状况等对胚胎移植的影响;⑨超排处理时使用GnRH、P₄、E₂、FSH、bST等激素能否改进超排效果。这些研究的结果不太统一,具体结论请从原文中查阅。^[3, 4, 6, 10, 11, 17, 33, 40, 42, 44, 45, 61, 65, 102, 116, 130]

§5.2 目前研究的难点

5.2.1 超数排卵效果能否预测及其提高的余地

从近十年 IETS 统计的结果看, 每头供体牛的超排水平为 6 枚可用胚, 每头供体羊的超排水平为 10 枚可用胚 (多个品种的平均值), 这是否为超排平均水平的最大限度 (家畜的生物学属性决定) 人们并未作出明确的结论。此外, 超排效果的不可预测性能否随着科技水平的进一步发展得到克服, 是一个令人们关心的话题^[10]。牛的商业化胚胎移植已经发展了三十多年了, 至今没有大的改进。因此说, 对卵泡发育、排卵机理以及其动力学的研究具有重大意义。目前, 对于供体牛的超排效果有一个统计表, 反映了超排的一般规律 (见表 19)^[85]。没有收集到羊的这方面资料。

表 19 供体牛的超排效果统计表

收集到的胚胎数 (number of collection)	供体所占百分率 (percent of donors)
0	22%
1	11%
2-4	33%
>=5	34%

5.2.2 超排方案的优化

对于超排方案的优化主要是依据母畜个体的生理状况差异和所处环境的不同对常规方案作一些随机的改动。牛有以下几个方面: ①依据以前的超排记录调整超排剂量, 对上次卵巢反应不够充分的母畜下次应适当增加剂量, 对上次反应过于激烈的母畜下次应减少剂量^[72]。②在超排处理开始时除去有功能的大卵泡。许多试验结果证明, 超排处理时存在大卵泡会抑制相对较小的卵泡的生长, 从而影响超排效果。Kim IH 等人的研究表明在超排前 48h 用超声引导抽吸除去优势卵泡可以促进其它卵泡的生长, 并提高排卵率和胚胎的产量^[88]。主要是指母牛。③对于 FSH 注射的次数应根据卵泡的发育状况来确定。如常规程序中, 在开始注射 FSH 的第 5 天, 母牛应出现发情, 若未发情, 则应在第 5 天继续注射小剂量的 FSH, 可以提高超排效果^[3]。而且每天应当直检以防止卵巢过度刺激的发生。④提高受精率和促进胚胎的发育。人们很早就发现超排处理会降低卵母细胞的受精率和减慢胚胎的发育速度, 而在常规的超排方案中, 并没有人为地预防这一现象。近年许多研究表明, 在第一次人工输精时同时皮下注射 500mg bST (bovine somatotropin, Posilac), 可以提高可用胚的数量。Moreira F 等人的研究表明: bST 通过提高受精率和早期胚胎发育的能力提高了可用胚的数量^[97]。在许多组织中, 包括卵巢, bST 可以刺激 IGF-I (胰岛素样生长因子-I) 的合成。Spicer 等人发现, 小卵泡同中等卵泡和大卵泡相比, IGF-I 的含量较低^[110]。Katz 等人发现在卵巢内部存在 IGF-I、受体和结合蛋白体系, 通过增强颗粒细胞的功能, 来改善超排反应^[87]。但是也有相反的报道, 用 bST 处理并没有改善母牛的超排反应^[81]。⑤简化超排程序。Dobrinsky JR 等人的研究认为,

FSH 多次注射比单次注射产生了更多的劣质胚胎^[72]。一次皮下注射 10ml 含有 30% 的 PVP(聚乙烯吡咯酮, 分子质量为 40000D, mg/g)的 FSH, 具有良好的超排效果。但目前在生产中使用的还较少, 多数人认为 PVP 难以溶解且效果不够稳定。⑥在超排处理时, 如气温急剧下降或连阴雨雪, 可以通过人为加强室内光照, 来尽量降低不发情或排卵障碍的出现。此外, 在配种后第 3 天, 阴道内放置海绵栓, 对防止黄体早期退化后导致的胚胎变性有一定作用。对羊超排方案改进的研究主要有①简化超排程序: 一次肌注溶于 PVP 的 FSH 300IU, 可取得较好的超排效果^[32]。②首次注射促性腺激素 FSH 时间: 在不用孕酮处理的超排程序中, 供体羊发情周期天数决定 FSH 注射时间, 当发情日至注射的天数加上 FSH 处理天数再加上停针至发情的天数(限制在 48h 内)约等于供体羊自然发情周期天数时, 超排发情率较高, 效果亦稳定^[40]。但各种优化措施均未能显著提高超排效果。

5.2.3 胚移工具的改进

上个世纪 60 年代至 80 年代, 对牛采胚器的改进进行了大量的研究工作。如英国的固定距离的三路式胚胎回收器, 德国的两路式采胚器, 美国的路式采胚器, 丹麦的路式胚胎回收器, 中国的 EP-3 型采胚管, 和法国的单人现场采胚器(把柄上有若干按钮, 可控制冲胚液进出)等。这些采胚器按照管道的多少可分为三种: ①一路式采胚管, 由一根导管和一到两个子宫颈塞组成, 冲胚液可触及整个子宫腔, 进出同路, 但管径较细, 适用于青年母牛; ②二路式采胚管, 一路是充气管, 与近前端的袖口状气泡相通, 另一路是冲胚液进出管, 冲胚前由进气管充气大约 15ml, 左(右)手在直肠内触摸, 可感到气泡逐渐充胀, 堵塞子宫角管腔, 冲胚液只能触及气泡以前的子宫角腔, 它既可用于成牛母牛也可用于青年母牛; ③三路式采胚管, 除冲胚液进出各占一路外, 其它与二路式采胚管相同, 管径较粗, 一般只用于成年母牛^[48]。目前, 这方面的研究报道很少。但应用新材料和新技术制造新型采胚器械是提高采胚效果的一个重要环节。

§6 本研究的设想与依据

20 世纪 80 年代, 胚胎移植技术已经逐步由实验室走向生产应用。在发达国家, 许多兽医院已将胚胎移植作为常规业务, 并且与之相关的配套器械和药品也应运而生。目前在发达国家, 体外受精技术和性别鉴定技术已经开始应用于生产实践。转基因技术已经在制药领域显示了美好前景。这些技术的发展也使得胚胎移植的重要性日益提高。

在激素方面, 目前的研究表明, 在超排处理前后或超排处理时使用 GnRH、P₄、E₂、FSH、bST, 并不能取得一致的有改善的预期效果^[37]。或许供体母畜卵巢本身的生理状况差异不可能用同一水平标准的激素处理来消除, 这就提示人们, 合适的

超排处理可以作为鉴定母畜卵巢潜在机能的指标之一。通过一次或几次超排处理,将结果与每个牛超排时的卵巢生理状况相比较,可以根据卵巢的大致状况及前次的超排效果将供体母畜分类处理。另外有一点必须强调,除了供体母畜的品种特性、个体差异,即使同一个体的同一体积的卵泡对促性腺激素的反应也并不都是一样的,并且任何两次的超排时所处的条件不可能一样。这些原因使得人们进行以“在一个卵泡波中出现更多的生长卵泡,尽可能整齐的排卵以及减少不受精率和变性胚胎数”为目的的试验时,会出现并不完全一致的结果。

本实验以前人的研究为基础,从以下几个方面对胚胎移植技术进行研究和分析:

(1) 促性腺激素的总量和种类;(2) 超排处理次数;(3) 受体移胚数与妊娠率的关系;(4) 受体卵巢状况与妊娠率的关系;(5) 季节对超排效果的影响;(6) “白黄体”供体胚移状况的分析。

§7 结束语

胚胎移植,作为畜牧产业中的一个新兴产业,无论在育种领域,还是在提高畜群整体遗传水平上,都会发挥越来越大的作用。北美和欧盟对生物技术在动物育种中的应用前景做了预测,指出到 2005 年将有 75% 的母牛是来自胚胎生物技术的产物^[49]。这些都说明胚胎移植技术在 21 世纪将有重大的发展。随着活体采卵、体外成熟、体外受精、体外培养技术的完善,体外生产胚胎的商业化应用会进一步提高;冷冻胚胎的使用率会越来越高,将会有大量冷冻胚胎库(frozen embryo bank)的出现;国际间的胚胎贸易也会随着全球经济一体化的进程而日益繁荣。中国在未来几年中,胚胎移植的规模会进一步扩大。由于中国已经加入 WTO,国内相关专业的公司和科研技术人员也应充分发挥自身的优势,积极参与这个大市场的竞争,推动中国畜牧业快速健康的发展。

试验研究

第二章 牛胚胎移植技术的研究与应用

§1 引言

1951年, Willett 等人首次进行牛的手术法胚胎移植获得成功^[2]。1964年, Mutter 等人首次通过子宫颈非手术法采集牛胚胎获得成功, 使得胚胎移植的研究日益得到人们的重视^[100]。从1970年开始, 牛的非手术采胚和移胚技术在器械、方法及各种影响因素的研究等方面均获得较大进展^[75,76,83,108]。到70年代末, 牛的非手术移植妊娠率与手术移胚妊娠率已无明显差异^[101]。80年代初, 此项技术已步入生产应用领域, 出现了规范化的操作程序和不同类型的移胚器械^[23,115,123]。此后, 该项技术在应用过程中不断得到改进和完善。

在国外, 应用该技术已使优秀母牛资源得到充分利用。如加拿大58%以上, 美国、法国50%以上的种公牛是应用胚胎移植技术生产的后代^[43]。我国从“六五”开始, 国家列项开始牛胚胎移植技术的研究。“八五”期间, 由北京奶牛中心等单位承担农业部攻关项目“奶牛MOET核心群的建立”, 累计处理供体牛278头次, 移植受体1214头次。“九五”期间, 牛胚胎移植技术分别列入国家攻关、“863”中试和农业部重点项目。国家攻关项目由中国农业科学院畜牧所与北京、黑龙江、山东、河南、山西等地联合承担, 五年来累计处理供体肉牛545头, 移植受体牛4971头次; 奶牛827头, 移植受体牛394头次。“863”中试项目“牛胚胎移植技术产业化研究”由新疆新科力生物技术与宁夏农业科学院畜牧研究所联合承担, 总计移植受体5272头次。农业部的重点项目由内蒙古家畜改良工作站承担, 1992~1999年累计移植受体牛4862头次^[14]。2002年4月15日, 农业部“万枚高产奶牛胚胎移植富民工程”项目在北京奶牛中心延庆基地正式启动。

1988年成立的西北农林科技大学奶牛胚胎移植试验站, 在“七五”、“八五”、“九五”期间先后承担了国家“863”高技术、国家攻关、农业部生物技术重点项目, 共进行了19项以牛为主的胚胎生物工程研究。该试验站和三原白鹿公司、武功畜牧兽医工作站、西安市解放军农场、西安市奶研所、西安市草滩农场等12个单位合作开展了奶牛胚胎移植技术的研究。1990年奶牛胚胎移植妊娠率平均为62.2% (28/54), 最高达78.3% (18/23), 其中一头供体牛一次采胚得到9头犊牛, 为国内首例^[5,6]。

本实验于2001年12月份至2002年4月份在宝鸡市得力康奶业公司和宝鸡市农牧良种场进行奶牛胚胎移植, 重点探讨促性腺激素的不同剂量和不同去栓时间对超排效果的影响。

§ 2 材料与方

§ 2.1 材料

2.1.1 实验动物

(1) 供体奶牛 宝鸡市得力康奶业公司和宝鸡市农牧良种场提供的荷斯坦奶牛, 年龄 2~8 岁, 共 9 头, 健康。

(2) 受体奶牛 由上述公司提供的秦川牛和部分奶牛, 成年, 共 72 头。

2.1.2 主要仪器和药品

(1) 奶牛非手术采胚和移植器械: 德国产。

(2) 实体显微镜: Olympus, 日本产。

(3) 促卵泡素 (FSH): Folltropin-V, 400mg/瓶, 澳大利亚产。

(4) 氯前列烯醇: 0.2mg/支, 宁波市激素制品厂。

(5) 孕激素栓: CIDR-B, 新西兰产。

§ 2.2 方

2.2.1 供体牛的超排处理

方案 1 在发情周期的任一天放 CIDR 栓, 记为 0d; 第 10d 开始递减剂量肌注 FSH, 每天 2 次, 连续 4 天, 总剂量 400mg~440mg; 第 12d 下午和第 13d 早上肌注氯前列烯醇各 3 支和 2 支 (0.2mg/支), 第 13d 早上去栓; 发情后输精 2~3 次, 每次间隔 10~12 h。

方案 2 第 13d 下午去栓, 其余同方案 1。

2.2.2 受体牛同期发情处理

在发情周期的任一天放 CIDR 栓, 记为 0d; 第 12d 早、晚肌注氯前列烯醇各 2 支 (0.2mg/支), 第 13d 早上去栓, 去栓后注意观察, 准确记录发情时间。

2.2.3 胚胎的采集

在供体发情后的第 7d (发情记为 0d) 进行采胚。在采胚前一天检查供体牛超排反应情况, 同时记下卵巢黄体数和卵泡数。使用二通式采胚管采胚, 采胚时将供体牛保定, 清空直肠粪便, 硬膜外麻醉, 洗净外阴部并消毒。采胚管用冲胚液冲洗后, 插入探针固定。将采胚管经子宫颈插入一侧子宫角大弯前部, 抽出探针少许, 再尽量将冲胚管送向子宫角尖端。向气囊充气 (10~15 ml) 固定。抽出探针, 然后用注射器灌注冲胚液 (每次 30~50 ml), 每侧子宫角分别用 500ml 冲胚液冲洗。回收时, 托子宫角前端, 使它成前高后低, 每次都要抽净。冲洗完毕, 放气, 抽出采

胚管。按同样方法冲洗另一侧子宫角。

冲胚结束后肌注氯前列烯醇 2 次, 间隔 12 h, 每次 2 支 (0.2mg/支)。

2.2.4 胚胎的评定

在放大 10~40 倍的实体显微镜下, 由回收的冲胚液内检出胚胎, 移入培养液内观察评定。胚胎评定标准如下: A 级胚胎, 透明带完整, 分裂球大小均匀, 结构紧凑; 囊胚细胞具有排列紧密的胚结和出现囊胚腔。B 级胚胎, 透明带完整, 分裂球大小不均, 或有细胞碎屑粘附。C 级为变性胚胎, 分裂球结构较松散, 30%左右的细胞破碎呈砂粒样。未受精卵, 无分裂球, 卵细胞质碎裂为砂粒样充满透明带, 卵周隙细小或过大。A、B 级为可用胚胎, 用于移植; C 级胚胎和未受精卵弃去不用。

2.2.5 受体的移植

选择与供体同步差在 $\pm 12\text{h}$ 以内的受体牛, 在移植前 1 天检查黄体状况, 选择有 A、B 级黄体的牛用来移植。黄体分级标准如下: A 级: 直径在 10mm 以上, 突出于卵巢表面, 质地坚实且边缘整齐; B 级: 直径在 5~10mm, 突出于卵巢表面, 且挺突, 与卵巢界限明显; C 级: 直径小于 5mm, 与卵巢实质不易分清, 或者质地松软。

2.2.6 资料分析

用 SPSS 软件进行相关数据的统计与分析。

§ 3 结果

§ 3.1 牛超数排卵的效果

3.1.1 不同剂量 FSH 的超排效果

不同剂量 FSH 的超排结果, 见表 1。

表 1 不同剂量 FSH (Folltropin-V) 处理荷斯坦奶牛超数排卵效果统计表

Table 1 Effect of different FSH (Folltropin-V, Australia) dose administration on response to superovulation in Holstein cows.

剂量 Dose	供体数(头) No. of Donors	黄体平均数(个) No. of CL/Cow	卵泡平均数(个) No. of F/Cow	采胚(卵)平均数(枚) Total Embryos/Cow	可用胚平均数(枚) Transferable Embryos/Cow
400mg	2	5.5 $\pm$ 0.5a	3.5 $\pm$ 0.5a	4.0 $\pm$ 0.0a	3.0 $\pm$ 0.0a
440mg	7*	7.7 $\pm$ 1.2a	2.3 $\pm$ 1.2a	7.3 $\pm$ 1.9a	3.6 $\pm$ 0.9a
总计 Total	9	7.2 $\pm$ 1.0	2.6 $\pm$ 0.9	6.6 $\pm$ 1.6	3.4 $\pm$ 0.7

注: ①同一列相同字母标记表示差异不显著 ($P>0.05$)。② * 其中有 2 头供体子宫有轻微炎症

Note: ① Numbers in the same column are not differ significantly ($p>0.05$). ② 2 donors had slight endometritis.

两种剂量的超排效果经 t 检验, 黄体数、卵泡数、冲胚数和可用胚数差异均不显著 ($P>0.05$)。

3.1.2 不同去栓时间的超排效果

不同去栓时间对超排结果的影响, 见表 2。

表 2 不同去栓时间对荷斯坦奶牛超数排卵效果统计表

Table 2 Effect of different time of removing CIDR-B on superovulatory response in Holstein cows.

方案 Method	供体数(头) No.of Donors	黄体平均数(个) No.of CL/Cow	卵泡平均数(个) No.of F/Cow	采胚(卵)平均数(枚) Total Embryos/Cow	可用胚平均数(枚) Transferable Embryos/Cow
方案 1 Protocol 1	2	5.5±0.5a	3.5±0.5a	4.0±0.0a	3.0±0.0a
方案 2 Protocol 1	4	6.0±1.3a	3.8±1.8a	7.5±3.3a	2.8±0.9a
总计 Total	6	5.8±0.8	3.7±1.1	6.3±2.2	2.8±0.5

注: 同一列相同字母标记表示差异不显著 ($P>0.05$)。

Note: ① Numbers in the same column are not differ significantly ($p>0.05$).

两种方案的超排效果经 t 检验, 黄体数、卵泡数、冲胚数和可用胚数差异均不显著 ($P>0.05$)。

§ 3.2 牛同期发情结果

共处理受体牛 72 头, 在撤栓后 72 h 内发情 67 头, 同期发情率为 93.1%(67/72)。

§ 3.3 牛胚胎移植结果

荷斯坦奶牛的胚胎移植结果统计列于表 3。

表 3 荷斯坦奶牛胚胎移植结果

Table 3 Results of embryo transfer in Holstein cows.

单位 Corporation	供体数(头) No.of Donors	可用胚数(枚) Transferable Embryos	移植受体数(头) No.of Recipients Transferred	产犊受体数(头) No.of Recipients Produced	妊娠率(%) Pregnancy Rate
宝鸡市得力 康奶业公司 Baoji Delicon Dairy Co.ltd.	3	14	13	7*	53.8a
宝鸡市农牧 良种场 BJELH Co.ltd.	4	11	11	9**	81.8a
宝鸡市农牧 良种场 BJELH Co.ltd.	2	6	4	2	50.0a
总计 Total	9	31	28	18	64.3

注: ①同一列相同字母标记表示差异不显著 ($P>0.05$)。

② * 其中有 1 头受体早产 1 公犊 ** 其中有 1 头受体流产。

Note: ① Numbers in the same column are not differ significantly ($p>0.05$).

② * 1 of recipients produced 1 male calf early ** 1 of recipients aborted.

经 X^2 检验, 三次胚移后妊娠率间无显著差异 ($P>0.05$)。妊娠率平均为 64.3%(18/28)。

§ 4 讨论

§ 4.1 FSH 剂量对母牛超排效果的影响

FSH 剂量是影响超排效果的一个重要因素。两种剂量的超排效果比较见表 1, 经对样本数据分析表明两种剂量间超排效果差异不显著。原因可能是小范围内的剂量变动对超排反应影响被动物个体间的差异所抵消。本试验每头供体所得可用胚数少, 主要由于供体牛数量少, 无选择余地。其中两头供体牛子宫有轻微炎症, 使变性胚胎增多。

§ 4.2 去栓时间对母牛超排效果的影响

方案 1 中, 去栓在第 7 次注射 FSH 时进行; 方案 2 中, 去栓在第 8 次注射 FSH 时进行。二者的超排效果差异不显著, 但可以看出方案 2 (冲胚数 7.5 ± 3.3 枚) 的超排效果稍优于方案 1 (冲胚数 4.0 ± 0.0 枚)。有资料报导, 使用外源性孕酮可以阻止排卵前的内源性 LH 峰的出现, 这样延长了排卵前卵泡的发育时间, 从而增加了成熟卵泡的数量^[38,125]。因为当发育较早的卵泡诱导 LH 峰出现时, 还可能不存在有成熟的卵泡。采用方案 1 获得的可用胚比例为 75.0% (3/4), 采用方案 2 获得的可用胚比例为 37.3% (2.8/7.5), 可用胚比例下降, 原因可能是外源性孕酮的处理引起输卵管环境改变而导致胚胎发育受到了影响, 这与 Vande 等人的报道相一致^[125]。另外, FSH 用量过大, 也可降低胚胎的可用率。激素间的作用关系比较复杂, 且本实验样本数量少, 更明确的原因需要进一步探讨。

§ 5 小结

促性腺激素的剂量作为影响超排反应的一个重要因素, 尽管剂量的适当变动对超排效果的影响不显著, 但从数字上看, 剂量稍大一点效果较好 (400 mg 的 Folltropin-V 处理冲胚数为 4.0 ± 0.0 枚, 440 mg 为 7.3 ± 1.9 枚; $P > 0.05$)。在牛的超排方案中, PG 与孕酮栓联合使用时, 不同撤栓时间 (分别在第 7、8 次注射 FSH 时撤栓) 对超排效果的影响差异不显著。本实验采用 “PG+P₄+FSH” 的超排程序, 超排效果不理想。但是否就比不上过去使用的 “PG+FSH” 的超排程序, 因为实验样本量小不能肯定, 有待进一步扩大试验研究。

进一步研究的课题:

(1) 在使用 “PG+P₄+FSH” 的超排程序中, 扩大试验规模, 进一步明确注射 FSH, 注射 PG 与去栓时间对超排效果的影响。

(2) 明确 P₄ 和 bST 是否可以提高胚胎可用率, 进一步筛选在处理程序中应用的最佳时间点。

第三章 波尔山羊胚胎移植技术的研究与应用

§ 1 引言

波尔山羊原产于南非,以其生长快、体格大、体质强壮、肉质好、繁殖力高、适应性广而闻名于世^[32]。1959年南非成立了波尔山羊育种协会,制定出培育波尔山羊的品种标准。1970年将其列于国家品种性能测定计划,是目前为止唯一进行性能测定的肉用山羊品种^[41]。南非已经注册的改良波尔山羊,当前数量为120万只,并出口到德国、澳大利亚、新西兰、美国、中国等国家^[32]。我国自1995年开始少量引进,1998年以后开始大规模引进和推广^[11]。近两年来,国内山羊、绵羊的胚胎移植数每年在3万枚以上,使国内种羊数目迅速扩大,为杂交改良打下了基础^[52]。权富生等利用系统工程层次分析法对影响胚胎移植效益的因素进行分析,建立了MOET效益层次分析的数学模型,认为对胚胎移植效益影响最大的是技术因素,占66.94%;在技术因素中,超排效果和移植成功率影响最大,分别占32.99%和15.62%^[26]。本研究在生产应用中进行,着重研究改进同期发情和超数排卵效果的处理方案以及影响胚胎移植妊娠率的因素,进一步提高波尔山羊胚胎移植技术的效益。

§ 2 材料与方法

§ 2.1 材料

2.1.1 实验动物

(1) 供体 杨凌金坤生物工程股份有限公司、陕西绿色世纪生物科技开发有限公司和陕西省大禹种羊养殖有限公司等提供的成年波尔山羊。

(2) 受体 由上述公司提供的成年关中奶山羊,健康。

2.1.2 主要仪器与药品

(1) 羊用手术移植器械: 国产。

(2) 采胚管: 新西兰产。

(3) 实体显微镜: Olympus, 日本产。

(4) 促卵泡素(FSH): FSH, 10mg/瓶, 中科院动物研究所; Folltropin-V, 400mg/瓶, 澳大利亚。

(5) 氯前列烯醇: 0.2mg/支, 宁波激素制品厂; 0.2mg/2ml/支, 上海市计划生育科学研究所。

(6) 孕激素阴道栓: CIDR-G, 新西兰产; 羊用情酮栓, 南京农业大学。

(7) 孕马血清促性腺激素(PMSG): 天津市激素厂。

§ 2.2 方法

2.2.1 供体羊的超排处理

(1) 方案1 在发情周期的任意一天放CIDR栓或情酮栓, 记为0d; 第11d开始递减剂量肌注FSH, 每天2次, 连续4天, 剂量在360mg~440mg之间 (Folltropin-V, 澳大利亚产), 或9~11mg (FSH, 中科院产); 在第6次和第7次肌注FSH的同时肌注氯前列烯醇各2支 (0.2mg/支), 在第8次注射FSH的同时去栓。去栓后注意观察发情, 并及时配种。

(2) 方案2 去栓时间提前6h, 其余同方案1。

2.2.2 受体同期发情处理

(1) 方案1 在发情周期的任一天放CIDR栓或情酮栓, 记为0 d, 第12 d早肌注PMSG 200 IU, 第13 d晚和第14 d早肌注氯前列烯醇各1支 (0.2mg/支), 第14 d晚去栓。去栓后注意观察发情, 并用试情公羊试情, 以母羊稳定接受公羊爬跨为判断发情标准, 一日三次, 准确记录发情时间。

(2) 方案2 在第14 d早去栓, 其余同方案1。

为了便于生产中操作与准确记录, 以供体首次稳定接受爬跨时间为供体发情时间, 发情后配种, 每天按早、中、晚三个时间点为参考适时配种 (间隔6 h、6 h和12 h), 准确记录配种时间, 配种时间以距离最近的时间点为准进行统计。受体以首次稳定接受爬跨时间定为发情时间, 发情后每天按早、中、晚三个时间点试情 (间隔6 h、6 h和12 h), 直至发情结束, 准确记录试情结果。

2.2.3 胚胎的采集

在供体发情后的6~7d (发情当日记为0d), 采用手术法沿腹中线切开腹壁, 从盆腔取出子宫, 采用二通式采胚管回收胚胎, 两侧子宫分别用20~30ml 冲胚液冲洗, 同时记录卵巢黄体 and 卵泡数。在体视镜下检胚、计数和评定。胚胎评定标准如下: A级胚胎, 透明带完整, 分裂球大小均匀, 结构紧凑; 囊胚细胞具有排列紧密的胚结和出现囊胚腔。B级胚胎, 透明带完整, 分裂球大小不均, 或有细胞碎屑粘附。C级为变性胚胎, 分裂球结构较松散, 30%左右的细胞破碎呈砂粒样。未受精卵, 无分裂球, 卵细胞质碎裂为砂粒样充满透明带, 卵周隙细小或过大。A、B级为可用胚胎, 用于移植。

2.2.4 受体的移植、术后护理、妊娠和分娩

选择与供体同步差在 ± 12 h以内的受体羊, 采用手术法沿腹中线切开腹壁, 从盆腔取出子宫, 检查卵巢状况, 同时记下黄体 and 卵泡状况。只要存在正常黄体, 即可选为移植受体。将胚胎移至黄体外侧子宫角尖端, 常规手术法缝合腹壁, 术后注意护

理, 7天后拆线。对妊娠受体适当增加日粮营养, 以满足妊娠需要。妊娠后期更应加强管理, 防止流产, 并做好接产和羔羊护理工作。

2.2.5 资料分析

各胚胎移植点资料完整不一, 仅统计相关资料, 用SPSS软件进行处理与分析。

§3 结果

§3.1 不同药物与剂量处理对供体波尔山羊超排效果的影响

3.1.1 供体羊用不同方案处理对超排效果的影响

供体羊用不同方案处理后, 超排效果见表1。

表1 波尔山羊不同方案超排效果统计表

Table 1 Effect of different protocols treatment on response to superovulation in Boer goats.

方案 Methods	供体数(只) No.of Donors	平均黄体数(个) No.of CL/Goat	平均卵泡数(个) No.of F/ Goat	平均冲胚数(枚) Total Embryos/ Goat	平均可用胚数(枚) Transferable Embryos/ Goat
方案1 Protocol 1	24	33.3±2.2a	2.2±1.0a	22.4±2.3a	20.9±2.0a
方案2 Protocol 2	17	23.5±1.6b	6.9±1.6c	20.4±2.0a	18.8±2.1a
总计 Total	41	29.2±1.6	4.1±0.9	21.6±1.6	20.0±1.5

注: ①a, a表示差异不显著($P>0.05$); a, b表示差异显著($P<0.05$); a, c表示差异极显著($P<0.01$)。

②方案1与方案2均使用Folltropin-V处理, 总剂量为400 mg。

Note: ① No difference significantly between the 2 methods:a,a($p>0.05$);Differences between the 2 methods:a,b($p<0.05$); a,c($p<0.01$).② The dose of Folltropin-V was 400 mg in the 2 methods.

两种方案的超排效果经 t 检验, 平均黄体数差异显著($P<0.05$), 平均卵泡数差异极显著($P<0.01$), 平均冲胚数和平均可用胚数差异不显著($P>0.05$)。

3.1.2 FSH 对波尔山羊超排效果的影响

(1) 促性腺激素种类对波尔山羊超排效果的影响

比较Folltropin-V与中科院动物研究所产FSH的超排效果, 结果见表2

表2 不同FSH产品对波尔山羊超排效果统计表

Table 2 Effect of different kinds of FSH administration on superovulatory response in Boer goats.

种类 Type	供体数(只) No.of Donors	平均黄体数(个) No.of CL/Goat	平均卵泡数(个) No.of F/ Goat	平均冲胚数(枚) Total Embryos/ Goat	平均可用胚数(枚) Transferable Embryos/ Goat
Folltropin-V	18	19.3±2.1a	0.3±0.2a	19.8±2.4a	17.9±2.2a
FSH	17	22.4±1.5a	0.3±0.3a	18.9±1.9a	13.9±1.9a
总计 Total	35	20.8±1.3	0.3±0.2	19.3±1.5	16.0±1.5

注: ①同一列相同字母标记表示差异不显著($P>0.05$); ②Folltropin-V处理的总剂量为360 mg, 中科院动物研究所产FSH处理的总剂量为9 mg。

Note: ① Numbers in the same column are not differ significantly($p>0.05$). ② The dose of Folltropin-V is 360 mg and the FSH produced by Institute of Zoology of CAS was 9 mg.

经 t 检验, 两种促性腺激素的超排效果差异不显著 ($P>0.05$)。

(2) 促性腺激素剂量对超排效果的影响

①中科院动物研究所FSH不同剂量对超排效果的影响

不同剂量FSH对波尔山羊超排效果, 见表3

表3 不同FSH剂量对波尔山羊超排效果统计表

Table 3 Effect of different dose of FSH administration on superovulatory response in Boer goats.

剂量 Dose	供体数(只) No. of Donors	平均黄体数(个) No. of CL/Goat	平均卵泡数(个) No. of F/Goat	平均冲胚数(枚) Total Embryos/ Goat	平均可用胚数(枚) Transferable Embryos/Goat
9mg	7	23.3±2.8a	0.7±0.7a	18.3±3.2a	15.3±3.1a
11mg	10	21.8±1.7a	0.0±0.0a	19.3±2.4a	13.0±2.5a
总计 Total	17	22.4±1.5	0.3±0.3	18.9±1.9	13.9±1.9

注: 同一列相同字母标记表示差异不显著 ($P>0.05$)

Note: ① Numbers in the same column are not differ significantly ($p>0.05$).

经 t 检验, 不同剂量的FSH对波尔山羊超排效果差异不显著 ($P>0.05$)。

②Folltropin-V不同剂量对超排效果的影响

不同剂量Folltropin-V对波尔山羊超排效果的影响, 见表4。

表4 不同Folltropin-V剂量对波尔山羊超排效果统计表

Table 4 Effect of different dose of Folltropin-V treatment on superovulatory response in Boer goats.

剂量 Dose	供体数(只) No. of Donors	平均黄体数(个) No. of CL/Goat	平均卵泡数(个) No. of F/Goat	平均冲胚数(枚) Total Embryos/ Goat	平均可用胚数(枚) Transferable Embryos/Goat
360mg	9	21.3±3.1a	0.3±0.3a	23.4±2.0a	21.1±1.8a
440mg	9	17.2±2.9a	0.2±0.2a	16.1±4.1a	14.7±3.9a
总计 Total	18	19.3±2.1	0.3±0.2	19.8±2.4	17.2±2.2

注: 同一列相同字母标记表示差异不显著 ($P>0.05$)

Note: ① Numbers in the same column are not differ significantly ($p>0.05$).

经 t 检验, 不同剂量Folltropin-V对波尔山羊超排效果差异不显著 ($P>0.05$)。

3.1.3 季节与波尔山羊超排效果的关系

在不同时间, 对同一场家的波尔山羊进行了三次超排, 结果见下表。

表5 不同月份波尔山羊超排效果统计表

Table 5 Results of superovulation at different time in Boer goats.

开始处理时间 Treatment Start	供体数(只) No. of Donors	平均黄体数(个) No. of CL/Goat	平均卵泡数(个) No. of F/Goat	平均冲胚数(枚) Total Embryos/ Goat	平均可用胚数(枚) Transferable Embryos/Goat
13~15/8	24	33.3±2.2a	2.2±1.0a	22.4±2.3a	20.9±2.1a
7~8/10	17	20.9±2.0b	4.7±1.5a	17.8±2.2a	16.0±2.0a
4/11	8	21.1±4.1b	2.6±1.7a	19.3±5.5a	14.6±5.3a
总计 Total	49	27.0±1.7	3.1±0.8	20.3±1.6	18.2±1.5

注: 同一列相同字母标记表示差异不显著 ($P>0.05$), 不同字母标记表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: ① Numbers in the same column with same letter are not differ significantly ($p>0.05$); Numbers in the same column with different superscripts differ significantly ($p<0.05$).

经 t 检验, 8月份超排卵巢反应(平均黄体数)显著高于10月和11月份($P>0.05$),

但8、10、11月份之间超排效果(平均冲胚数和平均可用胚数)差异不显著($P<0.05$)。

3.1.4 超排次数对波尔山羊超排效果的影响

这里“重复供体”指第2次超排的供体，处理结果见表6。

表 6 超排次数对波尔山羊超排效果统计表
Table 6 Results of the superovulatory times in Boer goats.

组别 Group	供体数(头) No.of Donors	黄体平均数 (个) No.of CL/Goat	冲胚平均数(枚) Total Embryos/ Goat	可用胚平均数(枚) Transferable Embryos/ Goat
供体 Donors	11	25.4±2.2a	21.2±2.6a	18.7±2.7a
重复供体 Repeated Donors	24	18.7±1.5b	18.5±1.8a	14.7±1.8a
总计 Total	35	20.8±1.3	19.3±1.5	16.0±1.5

注：同一列相同字母标记表示差异不显著 ($P>0.05$)，不同字母标记表示差异显著 ($P<0.05$)。
Note: ① Numbers in the same column with same letter are not differ significantly($p>0.05$); Numbers in the same column with different superscripts differ significantly ($p<0.05$).

经 t 检验，首次超排供体的平均黄体数显著高于二次超排的供体 ($P<0.05$)，但超排效果差异不显著(平均冲胚数和平均可用胚数， $P>0.05$)。

§ 3.2 供、受体羊不同去栓时间对发情同期化的影响

同期供体指在去栓后36h内发情的供体；同期受体指在去栓后48h内发情的受体。受体比供体早0 h、6 h、12 h去栓，实验结果见表7。

表 7 不同去栓时间的供、受体的同期化效果统计表

Table 7 Effect of different time of removing CIDR-B on estrous synchronization in Boer goats.

组别 Group	供体发情率 Estrous rate of donors	受体发情率 Estrous rate of recipients	供体同期率Estrous synchronization rate of donors	受体同期率Estrous synchronization rate of recipients
同时去栓 Remove CIDR at the same time	100%(24/24) a	76.1%(274/360) a	100%(24/24) a	73.1%(263/360) a
早6h去栓 Recipient's remove CIDR earlier 6h	100%(20/20) a	84.8%(220/270) a	100%(20/20) a	80.7%(218/270) a
早12h去栓 Recipient's remove CIDR earlier 12h	100%(24/24) a	77.6%(264/340) a	100%(24/24) a	73.8%(251/340) a

注：同一列相同字母标记表示差异不显著 ($P>0.05$)
Note: ① Numbers in the same column are not differ significantly($p>0.05$).

经 X^2 检验，三种方法处理后供、受体发情率间差异不显著 ($P>0.05$)；供、受体同期率间差异不显著 ($P>0.05$)。

§ 3.3 影响受体妊娠率和产羔率的因素

3.3.1 受体黄体状况与产羔率的关系

受体的黄体依“大、中、小”分类(黄体突出卵巢表面部分直径 $>0.5\text{cm}$ 为大；

0.5cm $\geq$ 直径 $\geq$ 0.3cm为中；<0.3cm为小），结果统计见表 8。

表 8 黄体状况与妊娠率的关系统计表

Table 8 Effect of corpus luteum size on pregnancy rate.

黄体状况 Corpus Luteum Size	移植受体数(只) No.of Recipients Transferred	产羔受体数(只) No.of Recipients Produced	妊娠率(%) Pregnancy Rate
大 Large	23	16	69.6 (16/23) a
中 Medium	25	14	56.0 (14/25) a
小 Small	14	10	71.4 (10/14) a
总计 Total	62	40	64.5 (40/62)

注：同一列相同字母标记表示差异不显著 ($P>0.05$)

Note: ① Numbers in the same column are not differ significantly ($p>0.05$).

经 X^2 检验，受体黄体体积的大小对妊娠率的影响差异不显著 ($P>0.05$)。

3.3.2 供、受体同期化程度与产羔率的关系

N 表示“受体比供体早 n 小时发情”。

表 9 供、受体同期化程度与妊娠率的关系

Table 9 Effect of estrous synchronization in donors and recipients on pregnancy rate.

N(Recipient's estrous earlier N h)	移植受体数(只) No.of Recipients Transferred	产羔受体数(只) No.of Recipients Produced	妊娠率(%) Pregnancy Rate
-6 h	29	19	65.5a
0 h	29	18	62.1a
6 h	6	3	50.0a
总计 Total	64	40	62.5a

注：同一列中相同字母标记表示差异不显著 ($P>0.05$)

Note: ① Numbers in the same column are not differ significantly ($p>0.05$).

供、受体同步差时间在 $\pm 6h$ 以内，妊娠率之间差异不显著 ($P>0.05$)。

3.3.3 移胚数量对妊娠率的影响

表 10 关中奶山羊受体移胚数量对妊娠率的影响统计表

Table 10 Effect of the transfered embryo numbers on pregnancy rate in Guanzhong dairy goats.

移植胚胎 数(枚) No.of Transferred embryos	移植受体 数(只) No.of Recipients Transferred	产羔受 体数(只) No.of Recipients Produced	产双羔受体 数(只) No.of Recie- pents Produced 2 kids	产三羔受体 数(只) No of Recie- pents Produced 3 kids	妊娠率(%) Pregnancy Rate	产双羔率(%) Produced 3 Kids Rate	产三羔率(%) Produced 3 Kids Rate
1	42	26	0	0	61.9a	0	0
2	170	105	55	0	61.8a	32.4	0
3	33	26	8	5	78.8a	24.2	15.2
4	1	1	1	0	100a	100	0

注：同一列中相同字母标记表示差异不显著 ($P>0.05$)

Note: ① Numbers in the same column are not differ significantly ($p>0.05$).

经 X^2 检验，移胚数量 (1~4枚) 对受体妊娠率的影响差异不显著 ($P>0.05$)。

3.3.4 关中奶山羊同期发情处理后“假发情”羊的比例统计

关中奶山羊同期发情处理后，有发情表现但手术时发现没有黄体形成的羊的统计结果见下表。

表 11 关中奶山羊同期发情处理后“假发情”受体羊比例统计表

Table 11 Ratio of “fake” estrous recipients of estrous synchronization in Guanzhong dairy goats.

手术受体数(只) No. of Recipients Operated	移植受体数(只) No. of Recipients Transferred	“假发情”数(只) No. of “Fake” Estrous Recipients	“假发情”比例(%) Ratio of “Fake” Estrous Recipients
1698	1465	233	13.7%

关中奶山羊同期发情处理后，“假发情”羊的比例的为 13.7%。

§3.4 “白黄体”供体羊胚胎移结果

对一个场家的一次胚移结果统计分析。

表 12 “白黄体”供体羊胚胎回收率与移植产羔状况统计表

Table 12 Ratio of the results of flushing embryos and producing kids in “white” corpus luteum donors.

	供体数(只) No. of Donors	平均黄体数 (个) No. of CL/Goat	平均卵泡数 (个) No. of F/Goat	平均冲胚数(个) Total Embryos/ Goat	平均可用胚(个) Transferable Embryos/ Goat	平均产羔数(只) No. of produced kids/Goat
黄体正常供体 Normal CL Donors	49	20.1±1.1a	1.3±0.5a	17.1±1.3a	15.0±1.3a	5.2±0.6a
“白黄体”供体 “White” CL Donors	6	16.2±1.1a	3.3±1.3a	4.3±2.4c	4.3±2.4c	1.7±0.9b
总计 Total	55	19.7±1.0	1.6±0.5	15.7±1.3	13.8±1.2	4.8±0.5

注：a, a 表示差异不显著 ($P>0.05$)；a, b 表示差异显著 ($P<0.05$)；a, c 表示差异极显著 ($P<0.01$)。

Note: ① No difference significantly between the 2 groups: a, a ($p>0.05$)；Differences between the 2 groups: a, b ($p<0.05$)；a, c ($p<0.01$)。

经 t 检验，“白黄体”羊超排反应与正常黄体羊的差异不显著 ($P>0.05$)；平均冲胚数和平均可用胚数差异极显著 ($P<0.01$)，每只供体羊平均产羔数差异显著 ($P<0.05$)。

“白黄体”供体羊获得的胚胎移植后，受体妊娠率为 66.7% (8/12)；正常黄体羊获得的胚胎移植后，受体妊娠率为 57.5% (207/360)，经 X^2 检验，二者差异不显著 ($P>0.05$)。

§4 讨论

§4.1 影响波尔山羊超排效果的因素

4.1.1 外源性孕酮 (P_4)

在应用“PG+ P_4 +FSH”的超排程序中，延长去栓时间，大剂量的外源性 P_4 可以阻止排卵前内源性LH峰的出现，从而延长排卵前卵泡发育的时间，最终增加成熟卵泡的数量 [37,125]。有研究报道认为，增加血液循环中 P_4 的浓度可以重新建立下丘脑

对E₂的正反馈,促使GnRh/LH脉冲性释放以协助卵泡最后阶段的生长^[128]。本研究发现,对于波尔山羊,方案1与方案2(方案1比方案2撤栓时间晚6h)相比,二者平均黄体数差异显著($P<0.05$),平均卵泡数差异极显著($P<0.01$),平均冲胚数和平均可用胚数差异不显著($P>0.05$)。方案1胚胎可用率为93.3%(501/537);方案2胚胎可用率为92.2%(319/346),二者差异不显著($P>0.05$)。可以看出,延长去栓时间可以提高卵巢超排反应的效果,但冲胚数和可用胚数并未提高。原因还不清楚,作者认为可能是由于外源P₄改变了排卵前机体的内分泌范型,通过一系列不明机制降低了胚胎回收率,而最终没有增加冲胚的数量。

4.1.2 FSH 的种类和剂量

本研究发现 Folltropin-V(澳大利亚产,由猪脑垂体提取,去掉了84%的LH)与中科院产FSH的超排效果差异不显著($P>0.05$)。Folltropin-V的剂量“360mg”与“440mg”,中科院产FSH的剂量“9mg”与“11mg”之间的超排效果差异不显著($P>0.05$)(见表2,表3,表4)。但小剂量效果稍好一些。由此看出,FSH剂量不可再大,以免引起卵巢机能紊乱,可用胚数量下降。

4.1.3 季节

本实验在8、10、11月份在同一家(大禹公司)进行了三次胚胎移植工作。结果显示8~11月份获得的平均冲胚数与平均可用胚数间差异不显著(平均冲胚数分别为 22.4 ± 2.3 枚、 17.8 ± 2.2 枚、 19.3 ± 5.5 枚;平均可用胚数分别为 20.9 ± 2.1 枚、 16.0 ± 2.0 枚、 14.6 ± 5.3 枚, $P>0.05$)。在8月中旬开始处理超排卵巢反应较好,平均黄体数显著高于10、11月份(平均黄体数分别为 33.3 ± 2.2 枚、 20.9 ± 2.0 枚、 21.1 ± 4.1 枚, $P<0.05$)。随着时间的推移,可用胚数有降低趋势(见表5),这可能与后两次处理时天气不稳定有关,第2次处理时天气突然变冷,第3次处理后配种时天气突然下雪。赵霞等人认为季节对超排效果有重要影响^[51];余文莉等人认为在内蒙古7-9月份进行绵羊超排是失败的;最佳季节是10月中旬至11月下旬^[40]。其原因解释为母羊卵巢活动会随季节而变化,9-12月母羊卵巢活动旺盛,发情及排卵率在10月到达高峰。本研究认为,在陕西8~11月份均可进行波尔山羊的胚胎移植工作。

4.1.4 超排次数

首次处理供体羊超排卵巢反应显著高于二次超排的供体(8-11月份,平均黄体数分别为 25.4 ± 2.2 个、 18.7 ± 1.5 个, $P<0.05$)。二者超排效果虽差异不显著(平均冲胚数分别为 21.2 ± 2.6 枚、 18.5 ± 1.8 枚;平均可用胚数分别为 18.7 ± 2.7 枚、 14.7 ± 1.8 枚, $P>0.05$),但第二次超排供体羊的超排效果有降低趋势。这可能与第二次超排时供体羊对FSH耐受性提高有关,因此第二次超排时应适当加大FSH的

剂量。

4.1.5 其它因素

很久以前人们就知道营养对母畜的繁殖性能有很大影响，但是潜在的机制不完全清楚。对于绵羊，过多的能量摄入会引起机体孕酮浓度明显的减少^[66,79]。在本实验中，有放牧条件的公司，羊的营养状况较好，其胚移效果（包括超数排卵结果）也比较好；而没有放牧条件的公司胚移效果相对较差。

§4.2 供受体发情同期化程度

Alabart 等人研究认为，影响母羊胚胎移植妊娠率高低的主要因素是供、受体之间的同期化程度^[57]。供受体同期化程度一般应掌握在发情同步差为 0~-24h^[59]。母畜超排处理后排卵前的卵泡发育期变短，从黄体变化至排卵前 LH 峰出现时间间隔由 61 h 减少到 44 h^[63]。可见若以发情开始时间作为同期化标准，受体比供体早发情其排卵的同期化程度较好。亦有观点解释为由于受体没有 FSH 作用，发情稍晚一些，所以受体比供体提前去栓。马保华等报道，供、受体分别为安哥拉山羊和陕北绒山羊，波尔山羊和关中奶山羊（或成都麻羊），道赛特绵羊和小尾寒羊时，受体羊去栓时间应比供体羊早 12 h^[22]。对于判定发情同步差的方法，报道认为“发情结束时间判定发情同步差，因为无论羊的发情持续期多久，其排卵一般在发情结束前 4-6 h 或在终止后”^[21]。本研究以发情开始时间作为判定发情同步差的标准，以便于在实践中操作，并且在理论和实践中检验也是可行的。本研究发现，无论受体比供体早去栓 12h、6h 或同时去栓，其同期化程度虽差异不显著（ $P>0.05$ ，见表 7），但受体比供体早 6h 去栓效果稍好。

§4.3 影响受体妊娠率的因素

4.3.1 受体黄体状况

一般报道认为，受体羊只要有正常的黄体且无繁殖疾患，移植后均可获得正常的妊娠率。高志敏等人报道，受体羊只要存在正常黄体，有无卵泡存在，对移植后妊娠率没有影响^[71]。本实验进一步证实，黄体体积的大小对移植后妊娠率无显著影响。

4.3.2 移胚数量

赵霞等人报道移植 3 枚和 2 枚胚胎的受体妊娠率显著高于移植 1 枚胚胎；移植 3 枚胚胎的受体产双羔率高于移植 2 枚胚胎的受体产双羔率（移双胚产双羔率为 22.4%，三胚产双羔率为 46.2%）^[51]。本研究表明，移植三胚、双胚与移植单胚的受体羊妊娠率（78.8%、61.9%和 61.8%）差异不显著（ $P>0.05$ ）。移双胚产双羔的百分率为 32.4%（55/170）。

§ 4.4 “白黄体”供体羊超排与移植效果的研究

我们在实验中发现,黄体“发白”的供体羊有两种:一类有“红心”,类似于小的红体,占少数;另一类完全类似于黄体退化后形成的白体。有研究表明,黄体早期退化时胚胎的回收率可降至20%以下,且变性的胚胎增多。黄体早期退化多发生于排卵的第5天以后,在黄体退化以前回收胚胎,可望获得较高的回收率。黄体形成与发育取决于排卵前卵泡内外的生化环境,只有充分发育成熟的卵泡排卵以后,才能形成发育良好的黄体。由于激素比率失调,或使用促排卵激素(其他药物)引起未成熟排卵,不能形成发育良好的黄体或造成黄体早期退化。许多专家认为应激(气候、饲管和营养水平等)是造成这种状况的主要原因^[27]。“白黄体”羊超排反应与正常黄体羊的差异不显著($P>0.05$);平均冲胚数差异极显著($P<0.01$)。“白黄体”供体羊与正常黄体供体羊相比,胚胎回收率显著降低,虽然胚胎移植后不影响妊娠率,分别为66.7%(8/12)和57.5%(207/360),但由于平均可用胚数量极显著减少,所以每只供体羊获羔羊数显著减少($P<0.05$)(见表12)。

§ 5 小结

§ 5.1 影响供体超数排卵效果的因素

(1) 在应用PG+P₄+FSH的超排方案中,延长去栓时间可以提高超排反应的效果(33.3 ± 2.2 个和 23.5 ± 1.6 个, $P<0.05$)。虽冲胚数和可用胚数没有显著差异(冲胚数分别为 22.4 ± 2.3 枚和 20.4 ± 2.0 枚,可用胚数分别为 20.9 ± 2.0 枚和 18.8 ± 2.1 枚, $P>0.05$),但还是前者稍高一些。

(2) 中科院动物所产FSH和澳大利亚产FSH(Folltropin-V)对波尔山羊超排的效果差异不显著($P>0.05$);中科院动物所产FSH“9mg与11mg”和澳大利亚产FSH(Folltropin-V)“360mg与440mg”,不同剂量对波尔山羊超排的效果差异均不显著($P>0.05$)。

(3) 在陕西8~11月份对波尔山羊进行超排,结果无显著差异(冲胚数分别为 22.4 ± 2.3 枚、 17.8 ± 2.2 枚、 19.3 ± 5.5 枚;可用胚数分别为 20.9 ± 2.1 枚、 16.0 ± 2.0 枚、 14.6 ± 5.3 枚, $P>0.05$)。因此,在陕西8~11月份均可进行波尔山羊的胚胎移植工作。

§ 5.2 提高供受体羊同期化程度

以波尔山羊为供体、关中奶山羊为受体的胚胎移植试验中,受体比供体提前12h,6h或同时去栓,其同期化程度无显著差异(同期率分别为73.8%、80.7%和73.1%, $P>0.05$)。

§ 5.3 影响受体妊娠率的因素

(1) 受体羊黄体体积大小对胚胎移植妊娠率的影响差异不显著(黄体体积大、中、小对应的妊娠率分别为69.6%、56.0%和71.4%, $P>0.05$)。

(2) 移植三胚、双胚与单胚的受体羊妊娠率差异不显著(78.8%、61.9%和61.8%, $P>0.05$)。移双胚产双羔的百分率为32.4% (55/170)。

§ 5.4 “白黄体”供体羊胚胎移植效果

供体羊黄体为“白黄体”与正常黄体超排卵巢反应(平均黄体数分别为 16.2 ± 1.1 个和 20.1 ± 1.1 个)差异不显著 ($P>0.05$); 平均冲胚数 (4.3 ± 2.4 枚和 17.1 ± 1.3 枚) 和平均可用胚数 (4.3 ± 2.4 枚和 15.0 ± 1.3 枚) 差异极显著 ($P<0.01$); 每只供体获羔羊数 (1.7 ± 0.9 只和 5.2 ± 0.6 只), 差异显著 ($P<0.05$)。“白黄体”与正常黄体组胚胎移植妊娠率分别为 66.7% (8/12) 和 57.5% (207/360), 二者差异不显著 ($P>0.05$)。

进一步研究课题:

- (1) 简化超排程序;
- (2) 寻找降低“白黄体”供体羊比例的方法。

参考文献

1. 曹步凯, 黄永宏, 汪河海. 抑制素免疫与超数排卵. 中国畜牧杂志. 2000, 36 (4): 54-55
2. 陈北亨, 王建辰. 兽医产科学. 中国农业出版社. 2001. 325-337
3. 陈静波, 罗应荣, 宣柏华等. 供体母牛超数排卵在荷斯坦奶牛育种的应用效果及影响因素分析. 全国首届动物胚胎生物技术学术研讨会论文集. 乌鲁木齐. 2001, 93~101
4. 丁红, 玛依拉, 杨冬梅等. 促卵泡素和年龄对绵羊超数排卵效果的影响. 中国畜牧杂志. 1998, 34 (3): 18-20
5. 窦忠英, 樊敬庄, 贾靖国等. 通过阴道穹隆移植奶牛胚胎实验. 西北农业大学学报. 1993, 21 (增 2): 9-13
6. 窦忠英, 徐照学, 高志敏等. 奶牛鲜胚移植技术的研究. 西北农业大学学报. 1993, 21 (增 2): 4-7
7. 樊敬庄, 窦忠英, 王新庄等. 现场分割奶牛胚胎产生同胚双犊的研究. 西北农业大学学报. 1993, 21 (增 2): 1-3
8. 范必勤, 王公金等. 波尔山羊的胚胎移植. 江苏农业学报. 2000. 16 (1): 14
9. 冯建忠, 李树静等. 引进国外牛冷冻胚胎移植效果探讨. 中国草食动物. 2000. 2 (2): 15-16
10. 高建明, 胡明信, 吴学清. 奶牛超数排卵技术中几项问题的观察分析. 草食家畜. 1995, 6 (2): 17-19
11. 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. 农业生物技术学报. 2001. 9 (2): 167-170
12. 郭志勤. 加速胚胎移植技术产业化促进我国养牛业发展. 中国工程科学. 2000. 2 (3): 12-17
13. 郭志勤. 家畜胚胎工程. 中国科技出版社. 1998
14. 郭志勤. 中国牛胚胎移植技术产业化前景. 草食家畜 (增刊). 2001. 8: 10-14
15. 黄俊成, 史洪才, 杨梅等. 山羊超数排卵处理及影响因素的研究. 草食家畜 (增刊). 2001. 107-109
16. 简讯. 首例万枚羊胚胎移植工程在锡盟启动. 内蒙古畜牧科学. 2001. 22 (82): 23.
17. 李剑军. 影响超数排卵的主要因素. 黄牛杂志. 1998. 24 (4): 46-47
18. 李键. 四川省波尔山羊胚胎移植取得突破性进展. 四川畜牧兽医. 2000. 27 (2): 61.
19. 李裕强, 张涌. 山羊超数排卵和同期发情研究. 西北农业大学学报. 1997, 25 (3): 77-81
20. 刘积凤, 白晓坤, 柳楠等. 优质细毛羊胚胎移植技术的研究与应用. 吉林农业科学. 1998. 3: 75-78
21. 马保华, 李键, 张红等. 羊生产性胚胎移植的组织与技术程序. 草食家畜 (增刊). 2001, 112-118
22. 马保华, 王光亚, 赵晓娥. 胚胎移植受体山羊发情控制及配比问题的研究. 动物医学进展. 1999, 20 (3): 35-38
23. 马玉斌, 朱洵美, 庄海博. 非手术奶牛胚胎移植实验研究. 西北大学学报. 1981, (2): 95-103
24. 钱宏光. 国内外肉羊发展趋势及国内肉羊业存在的问题. 中国饲料工业信息网. 2002
25. 屈中泽. 应用 PGF 诱导山羊同期发情形成同期黄体及冷冻胚胎移植实验报告. 当代畜牧. 2001, 1: 5-6
26. 权富生, 王光亚. 影响胚胎移植效益的因素分析. 甘肃农业大学学报. 1996 (4): 391-394
27. 王建辰, 章孝荣. 动物生殖调控. 安徽科学技术出版社. 1998, 185-189

28. 王建辰. 从家畜胚胎移植展望畜牧业的发展前景. 陕西省科技情报研究所科技水平动向参考资料. 1980.21 (2): 49-60
29. 王建辰. 兽医产科学的发展现状与趋势. 兽医产科学进展. 陕西科学技术出版社. 1994, 1-11
30. 王建辰. 园丁生涯. 台湾中草药杂志社. 2001, 41-48
31. 王念功, 马群山. 奶牛胚胎移植实用技术的研究. 吉林畜牧兽医. 1998.5: 43
32. 王希朝. MOET 技术在布尔山羊杂交核心群育种中的应用. 西北农林科技大学 2000 届攻读硕士学位研究生学位论文. 2000
33. 王新庄, 窦忠英, 樊敬庄. 牛超排技术研究. 黄牛杂志. 1996. 22(4): 20-23
34. 吴铁荣. 供体母牛卵巢上黄体状态与超数排卵效果的关系. 黑龙江动物繁殖. 1996, 15-16
35. 吴延光, 于元松, 谭景和. 哺乳动物卵泡发育模式及其调控机理. 动物学杂志. 2002, 37 (6): 83-87
36. 谢启文. 现代神经内分泌学. 上海医科大学出版社. 1999, 31-32
37. 杨炜峰, 高志敏, 窦忠英. 母牛超数排卵的研究进展. 西北农林科技大学学报. 2003, 31 (2): 166-169
38. 杨炜峰, 徐小明, 高志敏等. 胚胎移植技术的现状与展望. 乳业科学与技术. 2002, (1): 29-33
39. 杨永林, 倪建宏, 皮文辉等. 不同超排方法对中国美利奴羊超排效果试验. 中国养羊. 1995, 3: 7-8
40. 余文莉, 李树静, 乌兰等. 绵羊胚胎移植技术在内蒙古的研究和应用. 畜牧兽医学报. 1999, 30 (2), 110-116
41. 袁安文, 薛立群, 蒲祖松. 我国波尔山羊的发展现状与展望. 湖南畜牧兽医. 1999, (12): 4-5
42. 岳奎忠, 于元松, 周佳勃等. 改进山羊超数排卵方法的研究. 东北农业大学学报. 2000, 31 (1): 72-76
43. 张嘉保, 刘健. 胚胎工程在肉牛生产中的应用及发展趋势. 黑龙江动物繁殖. 1998, 6 (2): 39-40
44. 张磊, 冉汝俊, 李金林等. 家畜超数排卵和胚胎移植的影响因素. 中国草食动物. 2000, 2 (4): 34-37
45. 张令进, 达来, 于清勇等. 用不同剂量 FSH 对波尔山羊进行超排处理及胚胎移植实验结果初报. 中国草食动物. 2000.4 (2): 13-14
46. 张一玲, 罗永娟, 马章全等. 提高同羊繁殖率的研究—同期发情试验(二). 畜牧兽医杂志. 1993, (2): 6-8
47. 张一玲, 渊锡藩. 青年奶山羊非繁殖季节诱发发情的研究. 中国养羊. 1988, (4): 16-18
48. 张翊华. 奶山羊非手术采胚和移胚技术的研究. 西北农业大学 1994 届攻读硕士学位研究生毕业论文. 1994
49. 张沅. 应用胚胎生物技术的奶牛育种方法. 草食家畜 (增刊). 2001, 35-40
50. 赵国财, 任志强, 任正友等. 波尔山羊胚胎移植初报. 当代畜牧. 2001, 3: 18~19.
51. 赵霞, 达米, 苏和. 胚胎移植技术在纯种德国肉用美利奴羊选育中的应用研究. 内蒙古畜牧科学. 草食家畜 (增刊). 2001, 125-140
52. 中华羊网. 河南养羊业发展方向. 综合信息. 2002. 10. 17
53. 中华羊网. 河南种羊竞价展销会: 一只种羊 8.6 万元. 市场信息. 2002. 10. 17
54. 中华羊网. 面对 WTO: 养羊业怎么办? 权威评论. 2002. 5. 29

55. 中央人民广播电台新闻. 2001.11
56. 朱玉林. 改善奶牛超数排卵效果的方法. 中国奶牛, 1994, (4): 31-33
57. Alabart J L, Folch J, Fernandez A et al. Screening of some variables influencing the results of embryo transfer in the ewe. *Theriogenology*. 1995, 44 (7): 1011-1026
58. Ali A, Lange A, Gilles M. Morphological and functional characteristics of the dominant follicle and corpus luteum in cattle and their influence on ovarian function. *Theriogenology*, 2001, 56: 569-576
59. Armstrong D T, Pfizner A P, Warnes G M et al. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *J Reprod Fert*. 1983, 67: 403-410
60. Baracaldo M I, Martinez M F, Adams G P. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*, 2000; 53: 1239-1250
61. Bari F. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep *Theriogenology*, 2001. 56 (1): 147-155
62. Bavister B D, Boatman D E, Collins K. Birth of rhesus monkey infant after in vitro fertilization and non-surgical embryo transfer. *Proc Natl Acad Sci*, 1984.81: 2218~2222
63. Bevers M M, Dieleman S J. Superovulation of cows with PMSG: Variation in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicles. *Anim Reprod Sci*, 1987, 15:37-52
64. Bo G A, Baruselli P S, Moreno D. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 2001, 57: 53-72
65. Boland M P, Crosby T F, Gordon I. Comparison of lambing out come in ewes after synchronization of estrous by progestagen or prostaglandin treatment. *J. Agric. Sci. Cama* 1978, (91): 756-766
66. Boland M P, Longergan P, O'callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, 2001,55(6):1323-1340
67. Cushman R A, Desouza J C. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. *Theriogenology*, 2001, 55: 1533-1547
68. d'Occhio M J, Sudha G, Jillella D. Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. *Theriogenology*, 1997, 47:601-613
69. Dejarnette J M, Wallace R A, House R B et al. Attenuation of premature estrus behavior in postpartum beef cows synchronized to estrous using GnRH and PGF. *Theriogenology*, 2001,56, 493-501
70. Dejarnette J M. Estrous synchronization : a reproductive management tool. [www. Selectsires.com](http://www.Selectsires.com)
71. Diskin M G, Austin E J, Roche J F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 2002, 23, 211-228
72. Dobrinsky J R, Overstrom E W, Duby R T. Effect of FSH type and number of injections on peripheral FSH concentrations, follicle numbers and embryo yield heifers. *Theriogenology*, 1995,43 (1): 245
73. Douglas C, Nelson W. Mteolysis following single injection of PGF_{2α} in sheep. *J. Anim. Sci.* 1973,37 (4): 990-993

74. Driancourt M A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. *Theriogenology*, 2001; 55(6): 1211-1239
75. Drost M, Brand A, Aarts M H. A device for nonsurgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology*, 1976.6 (5): 503-507
76. Elsdon R P, Hasler J F, Seidel G E. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*, 1976.6 (5): 523-532
77. Evans G, Maxwell W M C, Wilson H R. Superovulation and embryo recovery in Merino ewes. *Theriogenology*. 1994,41: 192
78. Geary T W, Downing E R, Bruemmer J E et al. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to Select Synch estrous synchronization protocol. *Prof Animal Science*, 2000, 16, 1-5
79. Gong J G. Influence of mefabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest Anim Endocrinol* 2002 Jul, 23 (1-2): 229-241
80. Gradela, Esper C R., Silva A R. Plasma concentrations of progesterone, 17 β -estradiol and androstenedione and superovulatory response of nelore cows (*Bos indicus*) treated with FSH *Theriogenology*. 1996. 45 (4): 843-850
81. Gray B W, String fellow D A, Riddell M G. The effect of treatment with bST on the superovulatory response of cattle. *Theriogenology*, 1993, 39: 227
82. Greve T, Callesen H 著. 梁冠生摘译. 外源性源性激素给胚胎移植带来的问题. 草食家畜. 1995, 3: 7-8
83. Greve T, Lehn-Jensen H, Rasbech HO. Nonsurgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology*, 1977,7 (4): 239-250
84. Hgttel P, Callesen H, Greve T. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*. 1991,35:91-108
85. <http://catlserver.tamu.edu/ansc/433/repro/reprolecture/embryotransfer.html>. Embryo Transfer and Related Technologies. 2001
86. Jabbour H N, Evans G. Ovarian and endocrine reponses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-P. *Anim.Reprod. Sci.* 1991,26: 93-106
87. Katz, Ricciarelli E, Adashi E Y. The potential relevance of growth hormone to female reproductive physiology and pathophysiology. *Fertil steril* ,1993, 59:8-34
88. Kim I H, Son D S,Yeon S H. Effect of dominant follicle removal before superstimulation of follicular growth ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology* .2001,55(4):937-945
89. Kohram H. Bousquet D, Durocher J. Follicular status and superovulation in cattle: a field trail. *Theriogenology*,1995, 43(1): 252
90. Lamb G C, Stevenson J S, Kesler D J et al. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and PGF for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Animal Science*,2001,79.2253-2259
91. Macmillan KL,Thatcher WW. Effects of an agonist of GnRH on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod*,1991,45, 883-889
92. Magyar S J, Hodges C, Seager S W J. Successful non-surgical embryo collection with surgical transfer in captive white-tailed deer. *Theriogenology*,1988.29 (1): 273
93. Mapletoft R B Summary of Embryo Transfer Activity in Canada for the Year 2000.Report of Embryo Transfer in Canada.2001
94. Mapletoft R J, Pierson R A. Factors affecting superovulation in the cow: practical

- considerations. Embryo Transfer Newsletter, 1993, 11: 14-24
95. Martinez M F, Adams G P, Mapletoft R J. Effect of LH or GnRH on dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Animal Reproductive Science*, 1999, 57: 23-33
 96. Mckelvey 等著, 徐刚毅译. 山羊胚胎的生物技术. 四川畜牧兽医. 1994.(增刊): 46-56
 97. Moreira F, Bandinga L, Burnley C. et al. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactation recipient cows. *Theriogenology*, 2002, 57: 1371-1387
 98. Moreira F, Diaz T, Thathcer WW. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses of dairy heifers. *J Animal Science*, 2000, 78, 1568-1576
 99. Mukerjee T K. Improvement of goats in the tropics through genetic and biotechnological methods. *International Conference on goats*. 1992, 26-36
 100. Mutter L R, Graden A P and Olds D. Successful non-surgical bovine embryo transfer. *Anim Breed Abstr*, 1964, 33: 219
 101. Newcomb R, Christie B and Rowson L E A. Comparison of the fetal survival rate in heifers after the transfer of an embryo surgically to one uterine horn and non-surgically to the other. *J Reprod Fert*, 1978, 52: 395-397
 102. Nolan R, Duby R T, Boland M P. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology*, 1998, 50 (8): 1263-1274
 103. Nuti L C, Minhas B S, Baker W C et al. Superovulation and recovery of zygotes from nubian and alpine dairy goats. *Theriogenology*, 1987, 28: 481-488
 104. Oguri N and Tsutsumi Y. Non-surgical egg transfer in mares. *J Reprod Fert*. 1974, 41: 313-320
 105. Patterson D J, Wood S L, Smith M F. Improved synchronization of estrous in postpartum beef cows with a progestin-GnRH-PGF. *J Animal Science*, 2000, 78, 218
 106. Patterson D J. Control of the bovine estrous cycle with MGA: methods of synchronizing or inducing estrous. *KY Beef Cattle Roundup*, 1990, 25-41
 107. Pursley J R, Mee M O, Wiltbank M C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF and GnRH. *Theriogenology*, 1995, 44, 915-923
 108. Rowe R F, Campo M R. A single Cannula technique for nonsurgical collection of ova from cattle. *Theriogenology*, 1976, 6 (5): 471-483
 109. Smith A K. Pregnancy rates for Grade 2 embryos following administration of synthetic GnRH at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology*, 2002, 57 (8): 2083-2091
 110. Spicer L J, Geisert R D. Concentrations of insulin-like growth factor-1, estradiol and progesterone in follicular fluid of ovarian follicles during early pregnancy in cattle. *Theriogenology*, 1992, 37: 749-760
 111. Srividya S D. Stimulation of mitogen-activated protein kinase by releasing hormone: evidence for the involvement of protein kinase C. *Endocrinology*, 1996, 137, (1), 304-311
 112. Stevenson J S, Kobayashi Y, Thompson K E. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of GnRH and PGF. *J Dairy Science*, 1999, 82, 506-515
 113. Stringfellow D A, Seidel S M. Manual of the international embryo transfer society (Third

- Edition). Illinois. USA. 1998
114. Sunderland S J, Knight P G, Bolan M P. Alteration in intrafollicular level of different mass forms of inhibin during development of follicular and luteal phase dominant follicles in heifers. *Biol Reprod*, 1996, 54: 453-462
 115. Takahashi Y. Transcervical bovine embryo transfer with Japanese metal AI instrument. *Theriogenology*, 1981, 15 (1): 4-15
 116. Thatcher W W, Moreira F, Santos J E P. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 2001, 55: 75-89
 117. Thibier M. 1995 Statistics on the World Embryo Transfer Industry. *Embryo Transfer Newsletter*. 1996. 14(4): 27-33
 118. Thibier M. The 1996 Embryo Transfer Statistics Around the World. *Embryo Transfer Newsletter*. 1997. 16(4): 26-33
 119. Thibier M. The 1998 Statistical for the World Embryo Transfer Industry. *Embryo Transfer Newsletter*. 1999. 17(4): 25-31
 120. Thibier M. The Animal Embryo Transfer Industry in Figures. *Embryo Transfer Newsletter*. 2001. 19(4): 14-22
 121. Thibier M. The IETS Statistics of in livestock in the world for the year 1999. *Embryo Transfer Newsletter*. 2000. 18(4): 24-28
 122. Thibier M. World Statistics of Embryo Transfers, the 1997 Report. *Embryo Transfer Newsletter*. 1997. 15(4): 26-34
 123. Thompson C K and Pogwell R L. A paracervical method for non-surgical transfer of bovine embryos. *Theriogenology*, 1982, 18 (6): 629-632
 124. Tonhati H, Lobo R B, Oliveira H N . Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cows. *Theriogenology*, 1999, 51 (6): 1151-1156
 125. Vande E E, Vos PLAM, Hjyttel P. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin treated heifers. *Theriogenology*, 2001, 55: 573-592
 126. Vos PLAM, Bevers M M, Willemse A H. Effect of suppression by a progesterone-releasing intravaginal device and subsequent induction by GnRH of the preovulatory LH surge on follicular function and development in PMSG/PG treated cows. *J Reprod Fertil*, 1994, 101: 43-49
 127. Wilson-Wiepz D and Chapman R J. Non-surgical embryo transfer and live birth in a llama. *Theriogenology*, 1985. 24 (2): 251-257
 128. Wiltbank M C, Gumen A, Sartori R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, 2002, 57, 21-52
 129. Wrenzycki C, De Sousa P, Overstrom E W et al. Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos. *Fertil* 2000 Jan; 118 (1): 69-78
 130. YaaKub H, Boland M P. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology*, 1999, 51 (7): 1259-1266

致 谢

偶尔读到一篇论文的致谢,觉得挺有意思,充满了人情味儿。“这里是表达作者挚情与真意的地方”,我觉得也是。三年了,也该回顾一下,写出内心的感受。

感谢导师窦忠英教授三年来对我研究、学习和生活上的关怀与指导。他渊博的学识造诣,严谨的治学态度,坚定的科学信念,简朴的生活习惯,平易的学者风范,将是我一生学习的楷模。导师每周组织的学术报告会,也使我们收益颇深。在论文完成之际,对导师致以崇高的敬意和诚挚的感谢。

在研究的立项、实验设计和论文撰写过程中,王建辰教授、钱菊汾教授、王建华教授、李权武教授、张彦明教授、宋晓平副教授、马保华副教授、靳亚平副教授和武浩副教授提出了许多宝贵的建议和意见。实验过程中,承蒙樊敬庄副教授和高志敏高级畜牧师的言传身教,使我在最快时间内掌握了牛、羊胚胎移植的操作技术;雷安民助理研究员、杨春荣助理研究员、华进联助理研究员、张守信老师、韩晓良老师、马霄飞助理兽医师、马晓玲同志、任永娟同志等也给予了无私的指导与帮助。还有博士生陈静波、冯秀亮、屈雷、杨学义、马勇江、效梅;硕士生徐小明、葛秀国、李勇、杨玉爱、王馨;本科生韩站朝、黄治国、孙亚东、葛昕、林少青等给予的热情帮助。在此,对各位老师和同学致以衷心的感谢!

感谢陕西绿色世纪生物科技开发有限公司、陕西省大禹种羊养殖有限公司、宝鸡市得力康奶业公司、宝鸡市农牧良种场和杨凌金坤生物工程股份有限公司等的大力支持,使得试验顺利完成。

感谢郑惠玲老师、张文慧硕士、王杰硕士和韩站朝同学在论文数据统计中给予的帮助,感谢王跃虎硕士、葛昕同学在论文整理过程中给予的帮助。

三年来,深深感受到西部大开发给“农科城”杨凌、母校和实验室带来的巨大变化。一栋栋崭新的教学楼,越来越便利的交通,越来越好的实验仪器,这些也让我感受到了自己的成长。李大钊说过:“只有学术上的发展,值得作大学的纪念”,愿母校变成培养人才的沃土。

最后,我要感谢我的家人,他们给予了我坚定的支持和爱护。

杨炜峰

2003年6月

个人简介

杨炜峰，男，1977年6月生，河南登封人。1996年9月考入西北农业大学兽医系，2000年6月获农学学士学位。2000年9月考入西北农林科技大学兽医产科学专业，攻读硕士学位，方向为哺乳动物胚胎工程。曾获“亚农奖学金”（1998）、“大北农奖学金”（1999）、“校三好学生”（2000）等奖励和荣誉。



在读期间发表论文三篇，有关杂志接收一篇：

1. 胚胎移植技术的现状与展望. 乳业科学与技术. 2002, (1): 29-33
2. 母牛超数排卵的研究进展. 西北农林科技大学学报. 2003, 31 (2): 166-169
3. 胚胎干细胞与胚胎生殖细胞. 西北农林科技大学学报, 2002, 30 (6): 237-240
4. 母牛不排卵状况的研究. 乳业科学与技术. 2003. (已接收)。