

## 影响杜泊羊冷冻胚胎移植成功率的因素

陈永昌<sup>1,2</sup>, 苏雷<sup>1,2</sup>, 和协超<sup>2</sup>, 和占星<sup>1,3</sup>, 张继才<sup>1,3</sup>,  
王芸<sup>1</sup>, 吴晓东<sup>2</sup>, 王继<sup>1</sup>, 季维智<sup>1,2,\*</sup>

(1. 云南中科胚胎工程生物技术有限公司, 云南昆明 650217; 2. 中国科学院昆明动物研究所, 云南昆明 650223;  
3. 云南省肉牛和牧草研究中心, 云南昆明 650212)

**摘要:** 采用引进的杜泊羊冷冻胚胎, 以云南当地绵羊为受体进行胚胎移植。同期发情处理了 158 只受体羊, 同期发情率为 82.91%; 对 102 只进行了胚胎移植, 实际移植率为 77.86%, 3 个情期内移植妊娠率达 74.5%; 出生 68 只, 产羔率达 66.7%。分析表明, 胚胎发育阶段及级别、卵巢黄体情况、以及胚胎移植技术熟练程度直接影响胚胎移植成功率; 此外, 受体羊的处理程序及移植后的饲养管理、移植时机的把握、移植季节以及胚胎冷冻及解冻方法也会影响杜泊羊移植妊娠率, 进而影响产羔率。

**关键词:** 杜泊羊; 冷冻胚胎; 胚胎移植; 产羔率

**中图分类号:** Q819; Q959.842; Q492 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853(2004)06-0560-04

## Effect Factors of Frozen Embryo Transfer in Dorper Sheep

CHEN Yong-chang<sup>1,2</sup>, SU Lei<sup>1,2</sup>, HE Xie-chao<sup>2</sup>, HE Zhan-xing<sup>1,3</sup>, Zhang Ji-cai<sup>1,3</sup>,  
WANG Yun<sup>1</sup>, WU Xiao-dong<sup>2</sup>, WANG Ji<sup>1</sup>, Ji Wei-zhi<sup>1,2,\*</sup>

(1. Yunnan Zhongke Embryo Biotechnology Co. Ltd., Kunming 650217, China;  
2. Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;  
3. Yunnan Provincial Beef Cattle & Pasture Research Center, Kunming 650212, China)

**Abstract:** 158 Yunnan local recipient ewes were synchronized, and 102 imported Dorper sheep embryos were thawed and transferred. The rates of synchronization and embryo transfer were 82.91% and 77.86%, respectively. Conception rate in the first three estrus cycles and birth rate was 74.5% and 66.7%, respectively. The results suggest that the effect factors of frozen embryo transfer in Dorper sheep include stage and class of embryo and corpus luteum. Besides, personnel techniques of transferring affect conception and birth rate directly. Besides, protocol of transfer, recipient breeding and management, timing and reason of embryo transfer are important to Dorper embryo transfer.

**Key words:** Dorper sheep; Frozen embryo; Embryo transfer; Birth rate

杜泊羊 (Dorper sheep) 以其生产力高、增重速度快、胴体品质好、适应性强、母性好、皮质优秀、抗逆性良好、食性广等综合优点, 被称为“钻石级”肉用绵羊 (Cloete et al, 2000; Elias et al, 1985)。近年来, 美国、澳大利亚、新西兰等国, 以及中东地区和南美洲都引进了杜泊羊。我国对这一优良品种也逐渐重视起来, 通过活体和胚胎两种形式进行引种。因活体引进存在价格高、引种质量

不高, 以及疾病传播等风险, 引进的数量十分有限, 限制了该品种在我国的迅速扩繁。通过引进纯种优质胚胎, 利用胚胎移植技术有望在较短时期内扩大杜泊羊在我国的存栏数量, 而国内现尚无成熟的技术经验可循, 为此我们开展了引进杜泊羊冻胚移植试验, 对影响杜泊羊冷冻胚胎移植成功率的相关因素进行分析, 旨在建立并优化杜泊羊胚胎移植技术程序。

收稿日期: 2004-06-02; 接受日期 2004-09-30

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: wji@mail.kiz.ac.cn

第一作者简介: 陈永昌 (1976-), 男, 硕士, 从事动物胚胎工程技术研发; E-mail: cyc315@163.com

## 1 材料与方 法

### 1.1 胚胎及来源

引自新西兰生产的体内冷冻胚胎。该胚胎均为体内发育至7 d回收的囊胚或桑椹胚,冷冻前为A级,经玻璃化冷冻保存。胚胎供体父母本为新西兰绵羊育种者协会(New Zealand Sheepbreeders' Association)注册的纯种杜泊羊,遗传背景清楚。

### 1.2 实验时间和地点

同期发情处理和胚胎移植分别在2003年9月下旬和10月下旬,羔羊接产在2004年3月中旬。试验地点在云南中科胚胎工程生物技术有限公司纯种杜泊羊繁育基地(云南省晋宁县宝峰)。

### 1.3 受体羊的选择及同期发情处理

受体羊为高加索羊和当地土种绵羊杂交后代。选择的受体羊健康、发情周期及繁殖机能正常,空怀,年龄2~5岁,经产,产羔后3个月以上,体重30 kg以上,膘情中等以上。

采用埋置阴道栓CIDR(新西兰Pharmacia & Upjohn Pty. Ltd.产品)和注射Folligon(澳大利亚Intervet Pty. Ltd.产品)的方法,按常规绵羊程序对受体羊进行同期发情处理。

### 1.4 胚胎解冻、分级及移植

引进新西兰胚胎解冻液及解冻方法,用Emcare ECTP-400胚胎解冻系统(6%甘油+10.3%蔗糖液、3%甘油+10.3%蔗糖液、10.3%蔗糖液)和Emcare Holding Solution液4步法解冻胚胎,环境温度保持在25℃左右,解冻温度为30℃。

胚胎在冷冻前发育至桑椹胚或早期囊胚阶段,解冻后根据胚胎形态及发育阶段对胚胎进行分级,分成A、B、C3个等级(Guo, 1998)。

在确定发情后的 $7 \pm 0.5$  d,用常规手术法进行胚胎移植,移植时对黄体进行分级(Chen et al, 2004),对有大黄体和小卵泡并存的,刺破小卵泡并移植,给每只受体羊均移植1枚胚胎。

### 1.5 移植后受体羊的饲养管理

移植后24 h内限量饲喂,以1/3饱为宜,3 d内控制采食量,不能吃得过饱,防止伤口破裂。分小群饲养,避免各种应激、拥挤。补充200~300 g配合饲料,加强饲养管理。在移植后3个情期内试情2次(即在移植后30~33 d和47~50 d分小群用试情公羊试情2次),2次均没有返情者定为妊娠,统计妊娠率。

计算预产期,提前1个月控制补饲量,产前1周由兽医跟踪看护,保证产房的环境卫生,对难产的进行助产,保证初生羔羊吃上初乳,加强哺乳羊的饲养管理。

### 1.6 数据处理

记录处理羊样本数、48 h同期发情数、移植受体数、产羔数,胚胎移植时记录黄体级别,解冻后观察胚胎发育阶段及形态,统计分析胚胎发育阶段及级别、卵巢黄体情况、以及胚胎移植技术熟练程度与妊娠率及产羔率之间的关系。结果用 $t$ -检验进行分析。

## 2 结果与分析

同期处理了158只受体羊;48 h内131只发情,同期发情率82.9%;实际移植了102只,可移植率77.86%;移植后在3个发情周期内试情,妊娠76只,妊娠率为74.5%;最终产羔68只,产羔率66.7%。不同因素对胚胎移植成功率的影响如下。

### 2.1 胚胎发育阶段和级别与产羔率的关系

杜泊羊发育至第7天的胚胎82%处于囊胚阶段,解冻后处于A、B级的胚胎占97%,从移植后产羔率来看,B级囊胚和A级桑椹胚差异不显著,B级桑椹胚的移植产羔率显著降低,C级桑椹胚和囊胚的移植产羔率均为0,囊胚移植后总的产羔率(70.2%)显著高于桑椹胚(50.0%)(表1)。

### 2.2 黄体级别与产羔率的关系

对不同卵巢黄体级别的受体移植后产羔率见表2。1、2、3级黄体的受体产羔率无差异,但它们显著高于4级黄体受体产羔率,对5、6级黄体级别的受体未做移植。

### 2.3 移植技术熟练程度对产羔率的影响

将初学者与已熟练掌握移植技术人员的移植结果作了统计比较。结果表明前者操作时间较长,产羔率也明显下降(表3)。

### 2.4 诊断妊娠数与产羔数的关系

将妊娠诊断结果和实际产羔情况进行了对照,102只受体羊经诊断妊娠76只,共出生了68只羔羊,其中仅有1只是由漏诊羊所生。

## 3 讨论与结论

目前国内肉绵羊的胚胎移植受体一般是小尾寒羊(Li et al, 2002; Wang LJ et al, 2003; Wang YJ

表 1 杜泊羊胚胎发育阶段和级别对移植产羔率的影响  
Table 1 Effect of embryo stage and class on Dorper birth rate

胚胎级别 Class embryo	受体数 No. of recipients	产羔数 (率, %) No. (rate, %) of birth	总产羔数 (率, %) Total No. (rate, %) of birth
囊胚 Blastula	A	36 (78.3) <sup>a</sup>	59 (70.2) <sup>e</sup>
	B	23 (63.9) <sup>b</sup>	
	C	0 <sup>c</sup>	
桑椹胚 Morula	A	7 (58.3) <sup>b</sup>	9 (50.0) <sup>f</sup>
	B	2 (40.0) <sup>d</sup>	
	C	0 <sup>c</sup>	

同列上标字母不同的平均数差异显著 ( $P < 0.01$ )。

Values in the same column with different superscripts show great significant difference ( $P < 0.01$ ).

表 2 黄体级别对移植产羔率的影响  
Table 2 Effect of corpus luteum class on Dorper birth rate

	卵巢黄体级别 Corpus luteum class				
	1	2	3	4	5—6
受体数 No. of recipients	8	48	35	11	29
产羔数 (率, %) No. (rate, %) of birth	6 (75) <sup>a</sup>	36 (75) <sup>a</sup>	21 (60) <sup>a</sup>	5 (45.5) <sup>b</sup>	未移植 Un-transplant

同列上标字母不同的平均数差异显著 ( $P < 0.01$ )。

Values in the same column with different superscripts show great significant difference ( $P < 0.01$ ).

表 3 移植技术熟练程度对产羔率的影响  
Table 3 Effect of techniques' on Dorper birth rate

移植情况 Transfer technique	操作时间 Time-consume (ind./min)	移植数 No. of transfers	返情数 (率, %) No. (rate, %) of oestrus	产羔数 (率, %) No. (rate, %) of birth
熟练人员移植 Master	6	73	15 (20) <sup>a</sup>	54 (74) <sup>a</sup>
初学者移植 Freshmen	15	29	11 (38) <sup>b</sup>	14 (48.3) <sup>b</sup>

同列上标字母不同的平均数差异显著 ( $P < 0.01$ )。

Values in the same column with different superscripts show great significant difference ( $P < 0.01$ ).

et al, 2003), 实验中选用的受体羊是云南当地高加索羊和当地土种绵羊杂交后代, 产羔率、成年体重等性能都不及小尾寒羊, 但实验结果表明, 同期发情率、妊娠率和产羔率均很高, 这与实验开展时的季节、气候及对受体羊完善的饲养管理都有一定的关系, 说明云南当地高加索羊和当地土种绵羊杂交后代可以作为杜泊羊胚胎移植的受体。我国的绵羊品种资源丰富, 有小尾寒羊、湖羊、大尾寒羊、洼地绵羊等, 还有一些引进肉羊的杂交后代, 这些绵羊都是潜在的杜泊羊胚胎移植受体。

供体和受体的生殖生理状态、两者生殖系统生理状态的同步化对胚胎移植的成功率和产羔率至关重要 (Wang YJ et al, 2003)。实验根据绵羊的生殖生理特点, 制定了切实可行的同期发情和胚胎移植程序, 提高了同期发情率和胚胎移植妊娠率。此外, 优质的胚胎质量、严格的手术操作规程, 无菌

意识及术后护理、饲养管理等提高了胚胎移植妊娠率。

近年来国内开展的绵、山羊胚胎移植大部分都是鲜胚移植 (Sang, 2003), 也有人引进经程序化冷冻的胚胎进行移植, 虽解冻过程较为方便, 但解冻后胚胎损失率 (3.7%) 和胚胎降级率 (12.47%) 均较高, 移植妊娠率 (55.3%) 不理想 (Wang LJ et al, 2003)。本次移植的胚胎是通过玻璃化冷冻方法保存的, 解冻时采用分步脱除冷冻保护剂的方法, 解冻后 A、B 级胚胎达 97% 以上。这比用程序化冷冻及解冻方法所获得的解冻存活率要高, 说明冷冻前胚胎质量很可靠, 胚胎冷冻及解冻方法的引进提高了移植妊娠率及产羔率, 同时, 胚胎解冻人员的熟练操作及对胚胎质量的准确辨别也是胚胎移植取得成功的保证。

有了高质量的胚胎和合适的受体羊群后, 移植

技术就成为保障移植妊娠率的重要因素。胚胎移植的主要过程包括腹壁切开、黄体级别判定、移植、缝合等,新手由于操作不规范,往往费时,长时间的手术操作对子宫会造成一定损伤,移植部位不到位以及黄体判断不准确等都会降低移植妊娠率。目前开展的肉羊胚胎移植大多采用腹腔镜(Li et al, 2002; Wang LJ et al, 2003),操作繁琐且成本高。我们在试验中采用严格的手术法,术后粘连和炎症情况没有发生。

胚胎移植时卵巢状况(黄体和卵泡)影响着胚胎的着床和胎儿的正常发育,黄体分泌的孕酮是维持妊娠的重要因素,黄体发育不好,分泌功能不足或退化就难以维持妊娠。实际操作中,卵泡和黄体并存的情况很常见。试验根据卵巢状况对黄体级别进行了划分,并对卵泡和黄体并存的卵巢作了一定处理,当大黄体、小卵泡并存时,刺破小卵泡后移植是一种可行的办法。

绵羊属于短日照动物,一般在秋、冬季节发情配种。在发情周期内,母羊无论是其内部生殖激素、卵巢、生殖道、还是外在的表现和行为变化均会出现正常的周期性变化。试验选在秋季进行,正是当地绵羊的发情季节,取得了较为理想的结果。说明要取得胚胎移植的成功,选择适当的季节至关重要。

目前已经建立的羊早期妊娠诊断方法有多种,

主要有外部观察法、公羊试情法、超声波诊断法、血或乳中孕酮测定法等(Sang, 2002)。外部观察法由于主观因素较大,准确性不高。血或乳中孕酮测定法程序繁琐。生产实践中最常用的有公羊试情法和B-超仪诊断法。B-超仪诊断较为准确,但仪器比较昂贵,限制了普及应用范围。公羊试情法是最早建立起来的一种简便、经济的方法,但准确率不如B-超仪诊断法,为了增加该方法的准确率,我们采用在移植后的第2和第3个发情周期连续试情2次,2次均不发情的视为妊娠。从产羔结果看,出现一只漏诊出生的羔羊,说明试情法虽不完全准确,但可信程度高。

综上所述,胚胎发育阶段、级别,受体羊的选择、处理及其卵巢黄体情况,以及操作者移植技术的熟练程度等,均是影响杜泊羊胚胎移植成功的主要因素;此外,移植时机,移植季节,胚胎冷冻、解冻方法,以及移植后的饲养管理等,也是影响胚胎移植成功的因素。本实验是国内开展较早且规模较大的杜泊羊胚胎移植试验,在同期发情处理、胚胎移植和产羔率方面均取得了突破,是目前国内最为成功的绵羊冷冻胚胎移植试验,建立的较为完善的杜泊羊胚胎移植技术程序可以向全国推广。国内许多绵羊都可以作为杜泊羊胚胎移植的受体,优秀肉用杜泊羊品种在我国的种群数量有望迅速扩大。

## 参考文献:

- Chen YC, Wang J, He ZX, Zhang JC, Wang Y, He XC, Wang B, Wu XD, Su L. 2004. Application of frozen embryo transfer in Dorper sheep [J]. *Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 10: 32-34. [陈永昌, 王继, 和占星, 张继才, 王芸, 和协超, 王波, 吴晓东, 苏雷. 2004. 杜泊羊冷冻胚胎批量移植试验. 黑龙江畜牧兽医, 10: 32-34.]
- Cloete SW, Snyman MA, Herselman MJ. 2000. Productive performance of Dorper sheep [J]. *Small Ruminant Research*, 36 (2): 119-135.
- Elias E, Cohen D, Dayenoff P. 1985. Characteristics and indices of reproduction in Dorper sheep [J]. *J. S. Afr., Vet. Assoc.*, 56 (3): 127-30.
- Guo ZQ. 1998. *Animal Embryo Engineering* [M]. Beijing: Chinese Science and Technology Press. [郭志勤. 1998. 家畜胚胎工程. 北京: 中国科学技术出版社.]
- Li W, Wang J, Cong HM, Liu YF, Wang LJ, Li BY. 2002. Application of embryo transfer in fine mutton sheep [J]. *Heilongjiang Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 8: 10-11. [李武, 王健, 丛慧敏, 刘玉锋, 王丽娟, 李冰玉. 2002. 优质肉羊胚胎移植应用技术研究. 黑龙江畜牧兽医, 8: 10-11.]
- Sang RZ. 2002. *Animal Reproduction and Biotechnology* [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press. [桑润滋. 2002. 动物繁殖生物技术. 北京: 中国农业出版社.]
- Sang RZ. 2003. Development of Chinese embryo transfer technique in cattle and sheep [J]. *Heilongjiang Journal of Animal Reproduction*, 11 (2): 17-20. [桑润滋. 2003. 牛、羊胚胎移植在中国的发展. 黑龙江动物繁殖, 11 (2): 17-20.]
- Wang LJ, Zhang GM, Li W. 2003. Research of mutton sheep frozen embryo transfer technology [J]. *Grass-feeding Livestock*, 119 (2): 37-38. [王丽娟, 张广民, 李武. 2003. 进口肉羊胚胎移植试验. 草食家畜, 119 (2): 37-38.]
- Wang YJ, Tian XE, Chen YL, Ma BH. 2003. The effect of different development stage of the Dorper embryo on the results of frozen embryo transfer [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 19 (5): 10-11. [王永军, 田秀娥, 陈玉林, 马保华. 2003. 胚龄对Dorper羊冷冻胚胎移植效果的影响研究. 中国农学通报, 19 (5): 10-11.]