

全日制放牧 BMY 牛的活体采卵-体外胚胎生产-胚胎移植研究

和占星¹, 王 喆¹, 张继才¹, 王安奎¹, 金显栋¹, 袁希平¹, Joaquim M. Garcia²,
Marina R. de Lima², 何永珍¹, 黄必志^{1*}

(1. 云南省草地动物科学研究院, 昆明 650212; 2. Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Reproduction, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Sao Paulo State University, Jaboticabal, 14884-900, Brazil)

摘要: 为建立 BMY 牛的活体采卵(OPU)-体外胚胎生产(IVP)-胚胎移植(ET)快速扩繁技术体系, 从人工草地全放牧牛群中选择健康的经产空怀 BMY 牛作为供体($n=14$)集中 OPU 一次; 卵母细胞经 TCM-199 体外成熟培养(IVM)、Fert-TALP 液体外受精(IVF), 受精卵用合成输卵管液(SOF)体外培养(IVC)生产胚胎; BMY 牛受体($n=81$)用 CUE-MATE™ 孕酮阴道栓+EB+FSH+PG 方法同期发情处理, 对黄体合格的移植 OPU-IVP 来源鲜胚。研究结果表明: ①OPU 头均获卵母细胞 23.50 枚, 获 10 枚以上卵母细胞的供体占 85.7%; IVP 的平均囊胚数和可用胚数分别为 5.21 和 4.00 枚; OPU 前 8~9 d 卵巢上有黄体(CL)的供体, 头均获卵母细胞数及 IVP 的囊胚数、可移植胚数、囊胚率和可移植胚率分别比对照组高 7.28 枚($P<0.05$)、7.29 枚($P<0.05$)、6.00 枚($P<0.05$)、27.3%($P<0.01$)和 23.2%($P<0.01$); ②受体黄体合格率 69.1%(56/81), 胚胎移植妊娠率 37.5%(21/56), 产犊率 35.7%(20/56); ③受体在胚胎移植时注射 GnRH, 其妊娠率比对照组高 16.2%($P>0.05$)。结果显示, BMY 母牛具有良好的 OPU 潜力, 但个体间差异较大; 可通过严格供体选择及改善 IVP 技术等措施, 实现 OPU-IVP 效率最大化。CUE-MATE™+EB+FSH+PG 同期发情处理方法适于在牛规模化胚胎移植(ET)和人工授精(AI)中应用。综合应用 OPU、IVP、同期发情和 ET 技术是加快优良 BMY 牛扩繁的重要途径之一。

关键词: BMY 牛; 全日制放牧; 超声波引导采卵; 体外胚胎生产; 胚胎移植

中图分类号: S823; S814.8

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2013)01-0038-11

Ovum Pick up and *in vitro* Embryo Production and Embryo Transfer of BMY Beef Cattle under Whole Year Grazing System

HE Zhan-xing¹, WANG Zhe¹, ZHANG Ji-cai¹, WANG An-kui¹, JIN Xian-dong¹, YUAN Xi-ping¹,
Joaquim M. Garcia², Marina R. de Lima², HE Yong-zhen¹, HUANG Bi-zhi^{1*}

(1. Yunman Academy of Grassland and Animal Science, Kunming 650212, China; 2. Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Reproduction, Faculty of Agricultural and Veterinary Sciences, Sao Paulo State University, Jaboticabal, 14884-900, Brazil)

Abstract: The objective of this study was to establish a rapidly multiplication system of BMY cattle by the technology of ovum pick-up (OPU)-*in vitro* embryo production(IVP)-embryo transfer (ET). 14 BMY cattle with non-pregnancy, healthy and multiparous were selected for OPU once under whole year grazing in the artificial grasslands. Oocytes were matured *in vitro* in TCM-199

收稿日期: 2012-02-01

基金项目: 云南省科技创新强省计划-国际科技合作专项(2008AC001); 云南省技术创新人才培养项目(2010CI082); 云南省农业科技创新工程(2008LA018); 国家现代农业(肉牛)产业技术体系(CARS-038)

作者简介: 和占星(1963-), 男, 纳西族, 云南丽江人, 硕士, 研究员, 主要从事动物繁殖、育种研究, E-mail: hezx81@126.com, Tel: 0871-67391355

* 通信作者: 黄必志, 男, 博士, 研究员, E-mail: hbz@ynbp.cn

with 5% (*v/v*) fetal calf serum (FCS) and *in vitro* fertilization in Fert-TALP medium; zygotes were cultured in synthetic oviduct fluid (SOF) with 5% (*v/v*) FCS for embryo production. 81 BMY recipients were picked out for estrus synchronization treatment using CUE-MATE™ (Controlled intravaginal progesterone-release device) + estradiol benzoate (EB) + follicle-stimulating hormone (FSH) + prostaglandin F_{2α} analogue (PG), and recipients with a well-developed CL were transferred by BMY fresh embryos derived from OPU-IVP. The result showed that: ① Average donors with OPU were obtained 23.50 oocytes, and 85.7% donors offered more than 10 oocytes. Meanwhile, average blastocysts and available embryos of IVP were 5.21 and 4.00, respectively; Average oocytes, blastocysts, transferable embryos, rates of blastocyst and available embryo of donor ovaries with CL before OPU for 8 or 9 days were 23.57, 8.86, 7.00, 37.6% and 29.7%, respectively, significantly higher than those of control group (15.29, 1.57, 1.00, 10.3% and 6.5%, respectively, $P < 0.05$ or 0.01). ② Ratios of corpus luteum (CL) up to A-B graded, pregnancy rate and calving rate were 69.1% (56/81), 37.5% and 35.7%, respectively. ③ Pregnancy rates of recipients with injection GnRH at the time of ET was 46.2%, higher than that of control group (without GnRH) (30.0%, $P > 0.05$). The results indicated that BMY cows had better potential for OPU, but there was significant difference among individual donors. Moreover, the maximal efficiency of OPU-IVP was obtained by strictly selecting donors and improving technology of IVP and other measure. And the methods of CUE-MATE™ + EB + FSH + PG for estrous synchronization were suited for applying to ET and AI in a large scale cattle herd. Finally, the technology of OPU, IVP, estrous synchronization and ET were synthetically applied to speed up the expanding propagation of fine BMY cattle.

Key words: BMY cattle; whole year grazing; ultrasound-guided ovum pick-up; *in vitro* embryo production; embryo transfer

自 1982 年牛体外受精获得成功^[1]至 20 世纪 90 年代中后期的 10 多年时间,用于体外受精的卵母细胞均是从屠宰场宰杀后母牛的离体卵巢上采集获得的。1988 年采用超声波(B 超)引导从活母牛卵巢上采卵(Ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration)获得成功^[2],经不断改进目前这已成为从活体母牛卵巢上采卵(Ovum pick-up, OPU)的主要方法。

尽管 OPU 需要借助昂贵的设备,采卵操作难度较大,要求有丰富采卵经验的操作人员,但能有效地克服屠宰场来源卵母细胞进行体外胚胎生产(*In vitro* embryo production, IVP)的诸多不足(如从卵巢采集到运至实验室的时间难以保证及供体的遗传背景不清等)。同时,还可对幼龄^[3]、妊娠^[4-5]、繁殖障碍^[6]和老龄^[7]母牛采卵,且重复采卵对母牛生殖机能和健康不会造成不良影响^[2, 8-9]。OPU 与 IVP 和 ET (Embryo transfer) 技术结合,可极大地提高优秀母牛的利用率和繁殖效率,生产系谱齐全、遗传背景清楚的胚胎及其后代,缓解胚胎来源匮乏

的问题,促进胚胎移植的商业化进程,并为克隆和转基因等生物技术研究提供丰富的实验材料和必要手段。目前全球范围内已建立起一套牛 IVP 程序,并逐步走向商业化。在巴西,牛胚胎生产逐步由体内胚胎(*In vivo*-derived embryos)向体外胚胎(*In vitro*-derived embryos)转变^[10]。

BMY 牛是云南省从 20 世纪 80 年代初至今正在选育的热带亚热带肉牛,其血缘组成为 1/2 婆罗门(Brahman)、1/4 莫累灰(Murray grey)和 1/4 云南黄牛(Yunnan yellow cattle)。其特点是耐热、抗啤、适应性强;生长发育快、成熟早、繁殖力强;产肉性能好、肉质优良;乳脂率、乳蛋白高。BMY 牛在热带亚热带肉牛杂交改良中发挥着重要作用。有关婆罗门牛、BMY 牛的 OPU-IVP 及重复 OPU 对 BMY 母牛繁殖力的影响的研究已有报道^[7, 9, 11],但尚未开展从 IVP 到胚胎移植的系统研究。为建立针对 BMY 牛的 OPU-IVP-ET 快速扩繁技术体系,特开展本研究。

1 材料与方 法

1.1 供、受体母牛的选择与饲养管理

在采卵前 8~9 d, 用 B 超仪(SSD-900SE, Aloka, Co. Ltd, Tokyo, Japan) 检查 BMY 母牛子宫、卵巢(黄体、卵泡)状况, 选择年龄 3~11 岁、健康、体重为(420~621) kg、膘情中等、性周期正常的空怀母牛 95 头(其中供体 14 头, 受体 81 头)。供、受体在人工草地全日放牧饲养, 放牧草地以海法白三叶(*Trifolium repens* cv. Haifa)、威提特东非狼尾草(*Pennisetum clandestinum* cv. Whittet)、纳罗克非洲狗尾草(*Setaria sphacelata* cv. Narok) 为主。冬、春季节补饲全株玉米青贮。

1.2 供体分组

根据母牛卵巢上黄体(Corpus luteum, CL)和卵泡(Follicle)状况, 将供体分成 2 组: ① CL 组($n=7$, 年龄(8.43±1.67)岁, 体重(545.00±46.98) kg); 卵巢上有明显的黄体; ② 对照组(Control, $n=7$, 年龄(7.83±1.75)岁, 体重(555.83±73.35) kg); 卵巢上既无明显 CL、也无优势卵泡(Dominant follicle, DF)或 CL 和 DF 同时存在。

1.3 活体采卵(OPU)

1.3.1 采卵仪器及器具 B 超仪(B-mode ultrasound scanner, SSD-900SE)和 7.5 MHz 扇形阴道探头(Model: UST-M 15-2512)(Aloka Co. Ltd., Japan)、真空泵(COOK®, William COOK Australia PTY. Ltd.)、恒温槽(Fujihira, Industry co., Ltd., Japan); 采卵器具包括: 可更换的单腔金属采卵针(19 gauge、长度 6.0 或 6.5 cm、进针管、采卵管、连接部(Becton Dickinson, Curitiba Parana, Brazil)和集卵管(50 mL 离心管)(Falcon)。对探头背槽和进针管作了必要的改良。

1.3.2 采卵液 D-PBS(GIBCO)+肝素钠 10 IU·mL⁻¹(Sigma)+胎犊血清(Fetus calf serum, FCS)(Sigma)1%+青霉素(Sigma)100 μL·mL⁻¹+链霉素(Sigma)100 μg·mL⁻¹。

1.3.3 采卵前准备 将设备调试至工作状态, 真空泵负压调至 80~85 mmHg 范围。把与采卵相关的部件安装在探头上; 连接好集卵管、真空泵和采卵针等部件, 将集卵管置于 37.5 °C 恒温槽中。供体在保定架中站立保定, 清除直肠中粪便, 清洗和消毒外阴部; 用 2% 盐酸利多卡因(天津药业集团新郑有限公司)3~5 mL 进行硬膜外麻醉, 待母牛尾根松软无

力后采卵。

1.3.4 采卵 采用超声波引导穿过阴道采集卵母细胞(Transvaginal ultrasound guided oocyte collection)。一只手把 B 超探头缓慢地插入到阴道穹隆处, 并把握好, 另一只手通过直肠握卵巢并将其置于探头上, 从 B 超显示屏观察卵巢状况。采卵针吸满采卵液后插入装在探头上的采卵针筒中; 用直肠中的手移动卵巢使要穿刺的目标卵泡(直径 2~8 mm)位于 B 超显示屏采卵线上的最佳位置, 用把握探头的手推动进针管, 确定采卵针尖的位置, 使针头刺破阴道壁和卵泡壁, 同时脚踏真空泵开关, 吸取卵泡内容物(卵母细胞及卵泡液)到集卵管中。

1.4 检卵、卵母细胞的分级

卵泡液连同采卵液倒入滤器中(WTA, Brazil), 用含 10% FCS 的 PBS 液稀释、洗涤 3~4 次后将液体倒入培养皿(Falcon)或带有侧滤网的胚胎滤杯(Fujihira, Japan)中静置 10~15 min, 在实体显微镜(Olympus, SZ-ST, Tokyo, Japan)下收集卵母细胞。

根据形态学特征将卵母细胞分为 4 级: I 级: 卵母细胞色泽均匀, 卵母细胞周围包围 ≥4 层卵丘细胞, 卵丘-卵母细胞复合体(The cumulus oocytes complexes, COCs)完整, 致密有序排列; II 级: 卵母细胞质色泽均匀、卵母细胞周围包有 3 层卵丘细胞, COCs 完整; III 级: 卵母细胞色泽基本均匀、卵母细胞周围包有 1~2 层卵丘细胞, COCs 基本完整; IV 级: 卵母细胞质色泽基本均匀, 卵丘细胞与卵母细胞扩散(Oocytes with expanded cumulus)、裸卵(Denuded oocytes)、闭锁卵(Atresic oocytes)和退化卵(Degenerate oocytes)。选择 I、II、III 级及 IV 级中卵质较好的部分半裸卵和裸卵供 IVM。

1.5 卵母细胞的体外成熟(IVM)

培养液为 TCM-199(Gibco)+5% FCS(Gibco)+10 μL·mL⁻¹ FSH(Follitropin®-V, Bionche Animal health Canada INC)、10 μL·mL⁻¹ LH 和 10 μL·mL⁻¹ E₂。培养液在培养皿中将其做成多个 100 μL 的培养微滴, 每个微滴中放入 COCs 20~30 枚, 覆盖石蜡油, 在 38.5 °C、95% 空气、5% CO₂、饱和湿度条件的培养箱(Forma 3111, Thermo Fisher)中 IVM 20~22 h。

1.6 卵母细胞的体外受精(IVF)

8057 号 BMY 公牛冷冻精液(规格: 0.25 mL; 批号: 080126, 云南省草地动物科学研究院和云南省家畜冷冻精液站生产)按常规方法解冻后倒入离心

管内,加入 7 mL 精子获能液(Sperm-TALP),用离心机(H-103N,Kokusan,Japan)以 $1\ 800\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,尽快吸弃上清液,留 1~2 mL,用同样方法第 2 次离心,留 1 mL,加 1 mL 受精液(Fert-TALP),使稀释后精子活力达 0.40~0.45,密度 3×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 以上。经 IVM 的卵母细胞放入已加入精液的受精液微滴中(每滴 15~20 枚),在与 IVM 相同的培养箱中培养 5 h。

1.7 受精卵的体外培养(IVC)

受精卵用含 5% FCS 的合成输卵管液(The synthetic oviduct fluid,SOF)微滴,在与 IVM 相同条件的培养箱中培养 7~8 d,在第 7 天统计囊胚数。在倒置显微镜(DMIL,Leica,Germany)下观察胚胎形态,按国际胚胎移植学会(The international embryo transfer society,IETS)的胚胎分级标准分级,选择 A、B 级囊胚供移植。

BMY 牛供体的采卵(OPU)、IVP 程序如图 1 所示。

1.8 受体的同期发情处理与胚胎移植

用 B 型超声波诊断仪(SSD-900SE)对 BMY 空怀母牛的子宫、卵巢(黄体、卵泡)状况进行检查,共选择 81 头受体。根据受体卵巢上黄体与卵泡发育

状况分为 3 个组:①CL 组($n=34$):卵巢上有明显的黄体;②CL-DF 组($n=15$):卵巢一侧存在明显的 CL,另一侧有 DF;③DF-H-OV 组($n=32$):卵巢上存在 DF,或母牛正处于发情(Heat)或刚排卵(Ovulation)。受体牛同期发情处理与胚胎移植程序如图 1 所示;第 0 天放置孕酮阴道栓 CUE-MATE™(含 1.56 g 孕酮,Duirs PfarmAg Ltd.),同时注射苯甲酸雌二醇(Estradiol benzoate,EB)2 mg(宁波市三生药业有限公司);第 8 天撤出 CUE-MATE™,并注射 PGF_{2α}类似物(Analogue)-氯前列烯醇 0.4 mg(上海市计划生育科学研究所控股企业丹东市和华动物药有限公司)和注射 FSH 100 IU(宁波第二激素厂);不观察发情,在第 16~17 天用 B 型超声波诊断仪(SSD-900SE)检查受体的 CL 状况,选择 CL 合格的受体进行鲜胚(通过 OPU-IVP 获得)移植。对受体用 2% 盐酸利多卡因(天津药业集团新郑有限公司)3~5 mL 进行硬膜外麻醉后用非手术法移植胚胎;移植时随机选择 26 头受体注射 GnRH (Factrel®, Fort Dodge Animal Health, USA)100 mg \cdot 头⁻¹,30 头不注射 GnRH 作为对照组,在移植后 45 d 用便携式超声波诊断仪(HS-101V,HONDA,Japan)进行妊娠诊断。

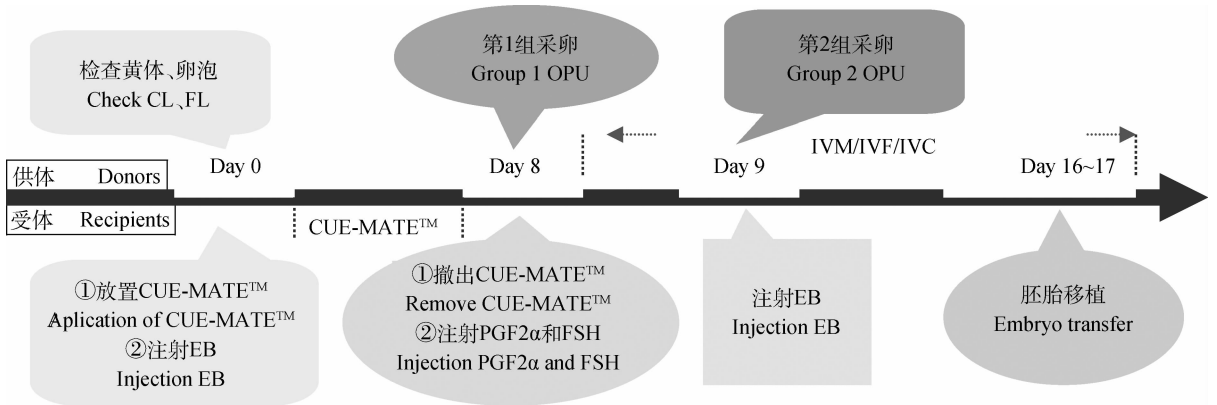


图 1 BMY 母牛的同期发情处理、OPU 及 ET 程序

Fig. 1 Estrous synchronization treatment, OPU and ET protocol of BMY cows

1.9 统计分析

采用 SPSS 11 进行 t 检验(t -test)和 χ^2 (Chi-square test)检验。

2 结果

2.1 OPU 及 IVP

2.1.1 OPU 及 IVP 结果 对 14 头 BMY 牛供体 OPU 一次,累计获卵母细胞 329 枚(头均(23.50 ±

10.56)枚),其中 I~III 级 242 枚(头均(17.29 ± 7.63)枚);获卵母细胞数 10 枚以下、11~20、21~30、31~40 和 41 枚以上的个体分别占 7.1%、35.7%、21.4%、28.6% 和 7.1%。选用 272 枚卵母细胞供 IVM,占获卵母细胞总数的 82.7%,其中 I~II 级卵母细胞 138 枚,占获卵母细胞总数的 42.0%,占供 IVM 卵母细胞总数的 50.7%。经 IVP 的囊胚率(囊胚数/IVM 卵母细胞数 \times 100%)为 26.8%(73/272),可移

植胚率(可移植囊胚数/IVM 卵母细胞数×100%)为 20.6%(56/272);头均囊胚数和移植胚数分别为

(5.21±7.41)和(4.00±5.95)枚。但 OPU 获得的卵母细胞数及 IVP 的囊胚数供体间差异较大(图 2)。

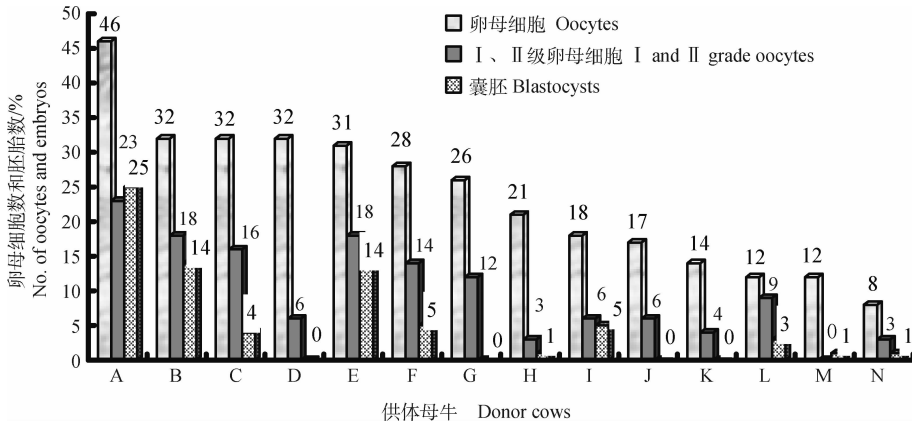


图 2 BMV 牛供体 OPU 获卵母细胞数及卵母细胞经 IVP 的囊胚数

Fig. 2 Number of oocytes from OPU and blastocyst from oocytes via IVP in different individual BMV donor cows

2.1.2 供体的卵巢状况对 OPU 及 IVP 效果的影响 如表 1 所示,CL 组供体,OPU 头均获卵母细胞

数比对照组多 7.28 枚($P < 0.05$)。

表 1 供体选择时(OPU 前 8~9 d)卵巢状况对卵母细胞数量和质的影响

Table 1 Effect of ovarian status of donor selected at 8 or 9 days before OPU on the quantity and quality of oocytes in donors(Mean±SD)

卵巢状况 Ovary status	供体数/头 Donor	卵母细胞数/枚 No. of oocytes				合计 Total
		I 级 Grade I	II 级 Grade II	III 级 Grade III	IV 级 Grade IV	
CL 组 CL group	7	5.00±3.70	8.00±4.16	7.43±3.41	6.71±2.29	27.14±11.38 ^a
对照组 Control	7	2.29±2.75	4.43±4.47	7.43±7.18	5.71±3.35	19.86±9.28 ^b

上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

The different superscript small letters mean significant difference($P < 0.05$)

由表 2 可见,CL 组供体头均获可供 IVM 的卵母细胞数比对照组显著多 8.28 枚($P < 0.05$);IVP 的囊胚数和可用胚数分别比对照组显著多 7.29 和 6.00 枚($P < 0.05$);CL 组的囊胚率和可用胚率比对

照组高 27.3%和 23.2%($P < 0.01$)。受精卵经 IVC 8 d 后,正常囊胚可发育到孵化阶段。

采集到的 COCs 见图 3,IVP 孵化囊胚见图 4。

表 2 供体卵巢状况对 OPU 获可用卵母细胞数及 IVP 囊胚数和可用胚数的影响

Table 2 Effect of ovarian status of donors on the number of available oocytes from OPU and blastocysts and viable embryos from IVP

卵巢状况 Ovary status	供体数/头 No. of Donors	体外培养 COCs 数/枚 No. of COCs for IVM	囊胚数/枚 No. of blastocyst	囊胚率/% Blastocyst rate	可用胚数/枚 No. of viable embryo	可用胚率/% Available embryo rate
		CL 组 CL group	7	23.57±10.66 ^a	8.86±9.21 ^a	37.6(62/165) ^A
对照组 Control	7	15.29±10.13 ^b	1.57±1.81 ^b	10.3(11/107) ^B	1.00±1.91 ^b	6.5(7/107) ^B

上标不同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$),上标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

The different superscript capital letters mean significant difference($P < 0.01$), the different superscript small letters mean significant difference($P < 0.05$)

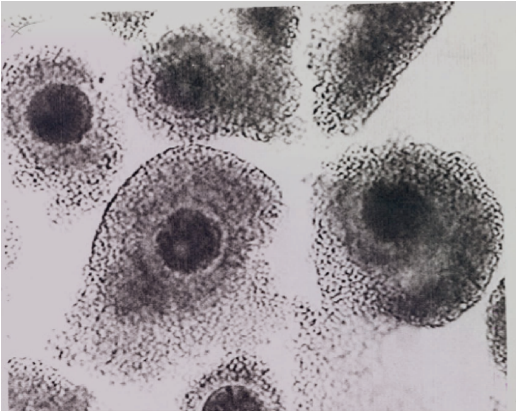


图 3 采集到的 COCs 200×
Fig. 3 Collected COCs 200×

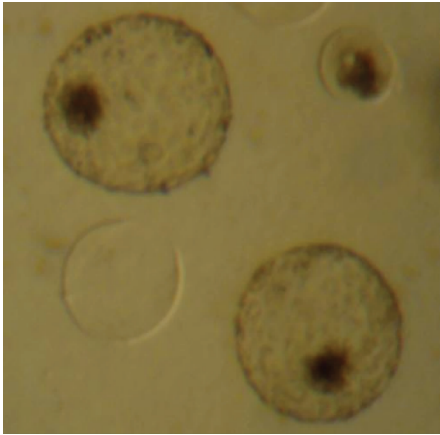


图 4 IVC 第 8 天的孵化囊胚 200×
Fig. 4 Hatched blastocysts on 8 day in IVC 200×

2.2 受体牛同期发情和胚胎移植

受体经同期发情处理后能正常排卵(形成 CL)的占 74.1%(60/81), CL 合格率(可移植率)为 69.1%(56/81), 胚胎移植妊娠率和产犊率分别为 37.5%(21/56)和 35.7%(20/56)。

如表 3 所示, 在选择的 81 头 BMY 牛受体中, 同期发情处理时卵巢上有 CL、CL-DF 和 DF-H-OV 的母牛分别占 42.0%、39.5%、18.5%; 受体经同期发情处理后, 移植时能形成 CL 的个体分别占 82.4%、73.3%和 65.6%, CL 和 CL-DF 组高于 DF-H-OV 组($P>0.05$), 但 CL 和 CL-DF 组、CL-DF 和 DF-H-OV 组比较, 差异也不显著($P>0.05$); 受体 CL 合格率(可移植率)同样以 CL 组和 CL-DF 组高于 DF-H-OV 组, 移植妊娠率以 CL-DF 组最高, 高于其他 2 组, 但均无显著差异($P>0.05$)。

2.3 BMY 母牛的排卵特点、移植妊娠率

如表 4 所示, BMY 牛受体($n=81$)经同期发情处理的同期排卵率(能形成 CL 母牛占处理总数的百分比)为 74.1%(60/81), 高于母牛在自然发情条件下的 61.7%(50/81)($P>0.05$)。在自然发情排卵的 50 头母牛中, 左、右卵巢排卵各占一半; 经同期发情处理后, 右侧卵巢排卵率极显著高于左侧($P<0.01$); 左、右侧的 CL 合格率差异不显著($P>0.05$), 右侧 CL 合格受体的胚胎移植妊娠率高于左侧 CL 合格的受体, 但差异不显著($P>0.05$)。

表 3 同期发情处理开始时 BMY 母牛卵巢状况对胚胎移植时黄体重和移植妊娠率的影响

Table 3 Effect of ovary status of BMY cows before synchronization on CL quality and pregnancy rate of cows with embryo transfer

处理开始时 母牛卵巢状况 Ovary status of cows	同期发情 处理母牛数/头 Synchronized cows	移植时形成黄体 的母牛数/头(率/%) No. cows of CL formed at the embryo transfer	移植母牛数/头(率/%) No. cows of embryo transferred	妊娠头数/头(率/%) No. cows of pregnancy
CL	34	28(82.4)	27(79.4)	8(29.6)
CL-DF	15	11(73.3)	10(66.7)	6(60.0)
DF-H-OV	32	21(65.6)	19(59.4)	7(36.8)

表 4 BMY 牛受体左右卵巢排卵比例及胚胎移植妊娠率

Table 4 Comparison of rates of pregnancy at day 45 and ovulation on the right or left ovary among BMY recipients

卵巢 Ovary	同期发情处理开始时 卵巢上有 CL 母牛数/头(率/%) No. of cows with CL when estrous synchronization	胚胎移植时 有 CL 母牛数/头(率/%) No. of cows with CL when embryo transfer	黄体合格数/枚(率/%) No. of transferable CL	移植妊娠数/枚(率/%) No. of pregnancy
	左 Left	25(50.0)	20(33.3) ^B	19(95.0)
右 Right	25(50.0)	40(66.7) ^A	37(92.5)	17(46.0)

2.4 胚胎移植时注射 GnRH 对受体妊娠率的影响

如表 5 所示,受体牛在胚胎移植时注射 GnRH,其妊娠率比对照组高 16.2% ($P>0.05$),表明 GnRH 有利于提高妊娠率。

表 5 GnRH 对 BMY 牛受体胚胎移植妊娠率的影响

Table 5 Effect of GnRH on pregnancy rate of embryo transfer of BMY recipients

处理 Treatment	移植头数/头 No. of recipients	妊娠头数/头 No. of pregnancy cows	妊娠率/% Pregnancy rate
注射 Injection GnRH	26	12	46.2
对照 Control (without GnRH)	30	9	30.0

3 讨论

3.1 BMY 牛的 OPU 潜力及影响 OPU-IVP 效果的因素

采用 OPU 可对母牛以每周 1~2 次的频率采卵^[12-14],但 OPU-IVP 的效率不尽一致。A. Garcia 和 A. W. Van Wagendonk-de-leeuw 等对母牛 OPU 一般可获卵母细胞 5~8 枚·头⁻¹·次⁻¹,IVP 后仅有 17% 左右的发育成可移植胚^[12, 15];N. Akyol 等^[16]对 8 头 3~7 岁荷斯坦母牛每周 OPU 一次,共采卵 122 次,头均获卵母细胞 1.9 枚·次⁻¹,经 TCM-199 培养液 IVM,BO 液 IVF 和 CR1aa 培养液 IVC 培养,仅获囊胚 7 枚;K. Roschlau 等^[5]对 1~17 岁荷斯坦母牛每周 OPU 一次,3 年内累计 OPU 3 437 头(其中 70% 为妊娠母牛),卵母细胞经 IVP 获可移植囊胚数仅为 1.9 枚·头⁻¹·次⁻¹;G. A. Presicce 等^[17]对 20 头 6~8 岁经产荷斯坦牛母牛 OPU,卵母细胞经 IVP 的囊胚率为 5%~66%,个体间差异很大;R. T. Beltrame 等^[18]对 20 619 头 Nelore 瘤牛供体累计采卵 71 602 次,经 IVP 获囊胚 7.12 枚·头⁻¹·次⁻¹。

3.1.1 供体年龄 有研究表明,不同年龄和生理状况,COCs 的数量和质量存在明显差异。采用 OPU 可从性成熟前的母牛、青年母牛和经产母牛获得卵母细胞^[19-21]。对 12~14 月龄西门塔尔牛 OPU,头均获 I、II 级卵母细胞为 12.2 枚,IVP 第 7

天的桑椹胚/囊胚率和第 9 天的孵化囊胚率分别达 44.7% 和 35.6%^[22];苏雷等对 BMY 青年牛、经产牛和老龄牛,间隔 4 d 采卵 1 次,共采卵 10 次,每次头均获卵母细胞数分别为 7.30、6.10 和 4.20 枚,I 级卵母细胞率分别为 10.4%、12.3% 和 6.2%,青年牛和经产牛高于老龄牛^[7]。但 OPU 获得的卵母细胞经 IVP 的平均囊胚数青年母牛(1.36 枚)低于经产母牛(1.97 枚)^[5]。本研究对 BMY 经产母牛 OPU 结果,头均获卵母细胞数和 I 级卵母细胞率均高于苏雷等^[7]的结果,IVP 的平均囊胚数高于 K. Roschlau 等^[5]的结果。这主要与供体的选择强度和 OPU 熟练程度等有关,但供体间差异大。OPU-IVP 最突出的应用是通过激素处理强制利用青春期前(Pre-pubertal)尚不具繁殖能力的母牛生产胚胎,提高母牛的利用率^[3, 23],而且 OPU 来源的卵母细胞经 IVP 发育到囊胚的能力比屠宰场来源卵巢上采集的卵母细胞强,胚胎质量更好^[22],但对青春期前 BMY 母牛的 OPU-IVP 效率如何有待进一步研究。

3.1.2 OPU 前 FSH 处理与否 供体牛在 OPU 前是否用 FSH 处理对获卵母细胞数量及 IVP 后囊胚率的影响,有不同的报道。供体牛在 OPU 前用 FSH 处理能增加卵母细胞数及 IVP 的可用胚数^[24];对比利时兰(Belgian blue)经产牛用 FSH 处理后 OPU,获 COCs 数和 IVP 的囊胚率分别为 11.8 枚和 29.0%,分别显著高于对照组的 4.1 枚和 17%^[25];对荷斯坦经产奶牛用 FSH 处理后 OPU,头均获 COCs 数和卵裂率低于对照组的 7.15 枚和 48.40%,但 IVP 的囊胚率(25.20%)极显著高于对照组(12.8%)^[17]。对 BMY 母牛在 OPU 前用 FSH 处理并不能增加 OPU 获卵数量,但有利于提高卵母细胞 IVP 的囊胚率^[7]。本研究在没有注射 FSH 的条件下对 BMY 经产牛 OPU,头均获卵母细胞数高于相关报道^[11, 25-26],接近 J. H. F. Pontes 等^[10]对瘤牛种 Nelore 牛 OPU 的结果(25.6 枚);平均囊胚率高于 G. A. Presicce 等^[17]、R. De Roover 等^[25]、S. A. Machado 等^[27]和 S. A. Chaubal 等^[28]的结果,与 L. Su 等^[11]和 Z. Roth 等^[26]的结果相近;可移植胚数达到在同等放牧管理条件下通过超数排卵-胚胎回收的水平^[29]。提示,在本研究基础上通过选择 OPU 时机和改善 IVP 条件,OPU-IVP 的效率有望进一步提高。

3.1.3 真空泵的压力 当 OPU 真空泵的压力

超过 50 mmHg 时,就会减少获卵母细胞数,并增加裸卵数^[30]。本研究以 80~85 mmHg 的压力对 BMY 牛采卵收到了良好的效果,这可能与采卵针的规格及真空泵的型号等有关。因此,真空泵的压力大小应根据采卵设备的性能和采卵操作熟练程度进行调整。

3.1.4 IVP 的条件 IVM 的时间、IVF 程序、培养液、培养气相等条件均会影响 IVP 的效果^[31-32]。牛卵母细胞 IVM 19 h 后经 IVF、IVC 的囊胚率(25.9%)高于 IVM 24 和 26 h 时^[33];受精卵用 TCM 和 SOF 培养的平均囊胚数差异不显著,但用 SOF 培养发育到囊胚的时间仅为 6 d,比 TCM 培养的早 1 d^[5];对 OPU 来源卵母细胞用 TCM-199 和 Menez-B2 培养液培养的囊胚率分别为 21%和 22%^[33]。本研究中,BMY 牛卵母细胞 IVM 20~22 h,经 IVF、IVC 获得较高的囊胚率,但批次间差异较大。

3.1.5 采卵时机对 OPU-IVP 效率的影响 母牛发情周期中从卵泡出现到发育至优势卵泡和排卵需要 11 d,一般出现 2 或 3 个卵泡波,每个卵泡波后总有 8~41 个新的卵泡补充^[34],Nelore 牛(*Bos indicus*)甚至有 3~4 个卵泡波^[35, 15],且瘤牛母牛每个卵泡波产生的卵泡数多于欧洲牛^[36]。出现 3 个卵泡波的母牛,第 1 个、第 2 个和第 3 个卵泡波分别发生在发情周期的第 6 天、第 15~17 天和发情前期,其中第 3 个卵泡波可发育成为排卵卵泡^[23, 37]。因而,一般选择在母牛发情后 3~4、9~10 和 15~16 d 进行 OPU^[38]。本研究在发情第 14~16 天 OPU,获卵母细胞数量多、质量好,且囊胚数和可用胚数均高,这主要是检查时卵巢上有 CL 的供体在 OPU 时正值第 2 个卵泡波的结果。与 R. T. Beltrame 等^[18]报道基本一致。提示,加大对供体的选择力度(性周期正常)和有效把握 OPU 时间可提高 OPU-IVP 效果。

3.2 BMY 母牛卵巢的排卵特点及对胚胎移植妊娠率的影响

S. E. Echterkamp 等^[39]通过直肠检查和腹腔镜检查结果表明,青年母牛右侧卵巢的排卵率(60.68%)显著高于左侧的 39.32%;R. A. Cushman 等^[40]对 3 910 头青年母牛调查表明,在 1 个情期中右侧卵巢平均排卵数(0.66 个 CL)极显著高于左侧卵巢(0.55 个 CL)。和占星等^[41]对 52 头 BMY 牛供体用 CUE-MATE+PG 同期发情处理的排卵率为 94.23%,其中右侧卵巢占 59.18%,显著高于

左侧的 40.82%。本研究表明,BMY 母牛在同期发情处理前,左、右侧卵巢的排卵基本一致,而经同期发情处理后不仅右侧卵巢的排卵高于左侧,而且右侧卵巢排卵母牛的胚胎移植妊娠率也高于左侧卵巢。和占星等^[42]对奶牛受体用 CUE-MATE+PG 同期发情处理结果表明,处理开始时卵巢上同时存在 CL 和 FL 的受体的同期发情率和 CL 合格率比只有 CL 或 FL 的高 8~10 个百分点。本研究中,BMY 牛受体在同期发情处理时,卵巢上同时存在 CL 和 FL 的胚胎移植妊娠率高于只有 CL 或 FL 及正在发情、刚排卵的受体。

3.3 受体同期发情处理效果及胚胎移植妊娠率

N. Kawate 等^[43]用 Ovcych+CIDR 对日本黑毛和牛受体同期发情处理,结果同期发情率、可移植率和妊娠率分别比单独用 PGF 处理的高。本研究采用 CUE-MATE+FSH+PG+EB 对 BMY 牛受体同期发情处理后定时胚胎移植(TET),由于在处理第 8 天撤 CUE-MATE 的同时注射了 PG 和 FSH,第 9 天注射 EB,在 PG 作用下溶解黄体,使受体血中孕酮含量降低,同时在 FSH 和 EB 的共同作用下,促进卵泡的发育、成熟和排卵,从而提高了受体的黄体合格率,而且不用发情观察,是一种有效的同期发情方法,适合在规模化 TAI 和 TET 中应用。

与体内胚胎(超排-冲胚获得)相比,体外胚胎(IVP)其耐冻性差、移植妊娠率低^[44-45]。OPU-IVP 来源荷斯坦奶牛鲜胚和冻胚的移植妊娠率分别为 49%和 40%^[5];泌乳期奶牛经 Ovcych 法同期发情处理后移植 OPU-IVP 来源鲜胚的妊娠率为 26.7%,显著高于玻璃化冷冻胚的移植妊娠率 7.4%^[46];以杂交牛为受体移植 OPU-IVP 鲜胚后 30 和 60 d 的妊娠率分别为 37.40%和 33.52%,分别显著低于移植体内胚胎的妊娠率 45.60%和 41.51%^[10],表明体内胚胎的移植妊娠率高于体外胚胎,鲜胚高于冻胚。此外,体外胚胎移植存在妊娠和分娩异常、增加流产、犊牛先天畸形、巨大后代综合症(Large offspring syndrome, LOS)、增加围产期的死亡率等问题^[33, 45, 47]。本研究 OPU-IVP 来源的 BMY 牛鲜胚移植的妊娠率高于 Y. M. Al-Katanani^[46]和 J. H. F. Pontes^[10]等的结果;低于 K. Roschlau 等^[5]的结果。本研究中所使用的供体、公牛(冻精)和受体均为 BMY 牛,IVP 胚胎移植后未出现母牛的妊娠、分娩异常及犊牛畸形等现象。

3.4 GnRH 对受体胚胎移植妊娠率的影响

GnRH 在母牛同期发情、人工授精(AI)和超数排卵中得到广泛使用。众多研究表明,在母牛配种或 AI 时使用 GnRH 能显著提高其妊娠率。在弗里斯兰(Friesian)×沙希华牛(Sahiwal)×辛地红牛(RedSindhi)三元杂种母牛 AI 时注射 GnRH 类似物的受胎率(68.75%)显著高于对照组(37.5%)^[48];对河流型水牛母牛在 AI 时和 AI 后 11~13 d 一次性肌注 GnRH(Fertagyl®)0.25 mg,42~55 d 的受胎率比对照组(25%)高 30%~33%^[49];泌乳期荷斯坦牛在 AI 第 5 天注射 GnRH 100 μg,AI 第 7 和 12 天血中 P₄(Progesterone,孕酮)水平及 AI 后 42~49 d 的妊娠率均高于对照组^[50]。本研究结果表明,BMY 牛受体在相同的放牧管理和同期发情处理条件下,在胚胎(OPU-IVP 来源)移植时注射 GnRH (Factrel®)能明显提高妊娠率。这主要是经同期发情处理后的受体母牛胚胎移植时正处于发情的第 6~7 天,已形成功能性 CL,在外源 GnRH 作用下保证了黄体的良好发育,并增强其生理功能,促进 LH 分泌,从而使血中 P₄ 水平提高并维持较高的水平,阻止或抵消 PGF_{2α} 溶黄体作用,为胚胎存活、继续发育提供保障,有利于黄体变成妊娠黄体,维持正常妊娠,减少早期胚胎死亡。提示受体牛在胚胎移植时注射 GnRH 有助于提高妊娠率。但牛卵巢组织上并无 GnRH 的特异受体,GnRH 所引起的黄体或滤泡功能的变化,是通过调节 LH 和 FSH 的释放而间接作用的,且 GnRH 在血液中的半衰期也非常短^[51]。在黄体期,特别 AI 后 5~15 d 内多次注射 GnRH 反而不利于妊娠率的提高^[52]。因此,只有正确掌握 GnRH 注射的时间、剂量和次数,才能保证发挥其功用。

4 结 论

选用卵巢发育良好、卵泡波正常的 BMY 母牛 OPU,可最大限度地提高优秀母牛的利用率和繁殖潜力,1 次 OPU 最多可获卵母细胞 46 枚;对 BMY 牛供体采卵的真空泵压力以 80~85 mmHg 为宜;用 Fert-TALP 液 IVF、SOF 液 IVC,最多可获囊胚 25 枚,但个体和批次间差异较大。用 CUE-MA-TE™+FSH+EB+PG 对受体牛同期发情处理效果好,适于在牛规模化 ET 和 AI 中应用;受体在胚胎移植时注射 GnRH 能有效提高妊娠率。OPU-IVP-ET 作为一项重要的繁殖新技术,在 BMY 牛的

快速扩繁中应用前景好。强化供体的选择、熟练采卵操作程度和优化 IVP 程序是提高 OPU 和 IVP 效率的关键。

参考文献:

- [1] BRACKETT B G, BOUSQUET D, BOICE M L, et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow[J]. *Boil Reprod*, 1982, 27(1): 147-158.
- [2] PIETERSE M C, KAPPEN K A, KRUIP T A M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries [J]. *Theriogenology*, 1988, 30(4): 751-761.
- [3] LOONCY C R, LINDSEY B R, GONSETH C L, et al. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows[J]. *Theriogenology*, 1994, 41(1): 67-72.
- [4] FUJITANI Y, HISHMURA K, KASAI K. Repeated and ultrasound guided transvaginal collection and *in vitro* development of bovine oocytes[J]. *Anim Sci Technol*, 1995, 66(12): 1023-1030.
- [5] ROSCHLAU K, ANDREAS K, ROSCHLAU D, et al. Practical use of OPU/IVP in modern cattle breeding[J]. *Arch Tierz*, 2001, 44 (Special Issue): 99-101.
- [6] BROGLIATTE G M, ADAMD G P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves[J]. *Theriogenology*, 1996, 45(6): 1163-1176.
- [7] 苏 雷, 和协超, 马 峻, 等. 年龄和 FSH 在肉牛活体取卵过程中对卵泡和卵母细胞发育的影响[J]. *动物学研究*, 2002, 23(5): 372-378.
- [8] MAJERUS V, DE ROOVER R, ETIENNE D, et al. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty[J]. *Theriogenology*, 1999, 52(7): 1169-1179.
- [9] 和占星, 张继才, 朱芳贤, 等. 重复活体采卵对全放牧肉牛繁殖力的影响[J]. *草食家畜*, 2003, (增刊): 128-130.
- [10] PONTES J H F, NONATO-JUNIOR I, SANCHES B V, et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the Nelor(*Bos indicus*) donor cows[J]. *Theriogenology*, 2009, 71(4): 690-697.
- [11] SU L, YANG S H, HE X C, et al. Effect of donor age on the developmental competence of bovine oocytes retrieved by ovum pick up[J]. *Reprod Dom Anim*, 2012, 47(2): 184-189.

- [12] GARCIA A, SALAHEDDINE M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development[J]. *Theriogenology*, 1998, 50(4): 575-585.
- [13] GOODHAND K L, WATT R G, STAINES M E, et al. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment[J]. *Theriogenology*, 1999, 51(5): 951-961.
- [14] HASLER J F. The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine [J]. *J Anim Sci*, 1998, 76 (Suppl. 3): 52-74.
- [15] VAN WAGTENDONK-DE-LEEuw A M, MULLAART E, DE ROOS A P, et al. Effects of different reproduction techniques; AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring[J]. *Theriogenology*, 2000, 53(2): 575-597.
- [16] AKYOL N, KIZIL S H, KARASAHIN T, et al. *In vitro* embryo production of cattle by ovum pick up (OPU) technique[J]. *J Lalahan Livest Res Institute*, 2008, 48(1): 1-11.
- [17] PRESICCE G A, XU J, GONG G, et al. Oocyte source and hormonal stimulation for *in vitro* fertilization using sexed spermatozoa in cattle[J]. *Vet Med Int*, 2010, 5: 1-8. doi:10.4061/2011/145626.
- [18] BELTRAME R T, QUIRINO C R, BARIONI L G, et al. Analysis of embryo production *in vitro* fertilization and embryo transfer to Neloer donors[J]. *Ci Anim Bras, Goiania*, 2010, 11(1): 17-23.
- [19] YANG X, PRESICCE G A, DU F, et al. Pregnancies and calves derived from prepuberal calf oocytes [J]. *Theriogenology*, 1997, 47(1): 163 (Abstract).
- [20] DONNAY I, DE ROOVER R, VAN LANGENDONCKT A, et al. Overall efficiency of an experimental ovum pick-up program[J]. *Theriogenology*, 1997, 47(1): 155.
- [21] LACAZE S, MARQUANT-LE GUIENNE B, DELALLEAU N, et al. Centralized *in vitro* embryo production after ultrasound guided bovine oocyte collection; effects of parity and superovulation treatment [J]. *Theriogenology*, 1997, 47(1): 161.
- [22] KARADJOLE M, GETZ I, SAMARDŽIJA M, et al. The developmental competence of bovine immature oocytes and quality embryos derived from slaughterhouse ovaries or live donors by ovum pick up[J]. *Vet Arhiv*, 2010, 80(4): 445-454.
- [23] HASLER J F, HENDERSON W B, HURTGEN P J, et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results [J]. *Theriogenology*, 1995, 43(1): 141-152.
- [24] GOODHAND K L, STAINES M E, HUTCHINSON J S, et al. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH[J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, 63(3-4): 145-158.
- [25] DE ROOVER R, FEUGANG J M, BOLSP E, et al. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation; a retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production[J]. *Reprod Domest Anim*, 2008, 43(2): 239-245.
- [26] ROTH Z, INBAR G, ARAV A. Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation[J]. *Theriogenology*, 2008, 69(8): 932-939.
- [27] MACHADO S A, REICHENBACH H D, WEPPERT M, et al. The variability of ovum pick-up response and *in vitro* embryo production from monozygotic twin cows[J]. *Theriogenology*, 2006, 65(3): 573-583.
- [28] CHAUBAL S A, MOLINA J A, OHLRCHS C L, et al. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows[J]. *Theriogenology*, 2006, 65(8): 1631-1648.
- [29] 和占星, 和协超, 张继才, 等. 全放牧婆罗门牛和 BMY 牛的超数排卵效果及激素水平比较[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(8): 39-43.
- [30] WARD F A, LONERGAN P, ERIGHT B P, et al. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovumpick-up technology[J]. *Theriogenology*, 2000, 54(3): 433-446.
- [31] LONERGAN P, RIZOS D, GUTIERREZ-ADAN A, et al. Oocyte and embryo quality: Effect of origin, culture condition and gene expression patterns [J]. *Reprod Domes Anim*, 2003, 38(4): 259-267.
- [32] NAGAO Y, IJIMA R, SAEKI K. Interaction between embryos and culture conditions during *in vitro* development of bovine early embryos [J]. *Zygote*, 2008, 16(2): 127-133.
- [33] MERTON J S, DE ROOS A P W, MULLAART E, et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in

- commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry[J]. *Theriogenology*, 2003, 59(2): 651-674.
- [34] ADAMS G P. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants[J]. *J Reprod Fertl Suppl*, 1999, 54: 17-32.
- [35] FIGUEIREDO R A, BARROS C M, PINHEIRO O L, et al. Ovarian follicular dynamic in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle[J]. *Theriogenology*, 1997, 47(8): 1489-1505.
- [36] CARVALHO J B P, CARVALHO N A T, REIS E L, et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based time AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers[J]. *Theriogenology*, 2008, 69(2): 167-175.
- [37] BOUSQUET D, TWAGRAMUBGU H, MORIN N, et al. *In vitro* embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach[J]. *Theriogenology*, 1999, 51(1): 59-70.
- [38] PIETERSE M C, VOS P, KRUIP T, et al. Characteristic of bovine estrous cycle during repeated transvaginal, ultrasound-guided puncturing of follicle for ovum pick-up[J]. *Theriogenology*, 1991, 35(2): 401-413.
- [39] ECHTERNKAMP S E, GREGORY K E, DICKERSON G E L, et al. Twinning in cattle: II. Genetic and environmental effects on ovulation rate in puberal heifers and postpartum cows and the effects of ovulation rate on embryonic survival[J]. *J Anim Sci*, 1990, 68:1877-1888.
- [40] CUSMAN R A, ALLAN M F, SNOWDER G. D, et al. Evaluation of ovulation rate and ovarian phenotype in puberal heifers from a cattle population selected for increased ovulation rate[J]. *J Anim Sci*, 2005, 83: 1839-1844.
- [41] 和占星. 全日制放牧 BMY 牛超数排卵及胚胎冷冻研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2009.
- [42] 和占星, 王 喆, 文际坤, 等. CUE-MATE、PGF_{2α} 诱导受体奶牛同期发情的效果[J]. *中国畜牧杂志*, 2004, 40(4): 28-30.
- [43] KAWATE N, SAKASE M, WATANABE K, et al. Oveych plus CIDR protocol for timed embryo transfer in suckled postpartum Japanese Black beef cow[J]. *J Reprod Dev*, 2007, 53(4): 811-817.
- [44] RIZOS D, WARD F, DUFFY P, et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality[J]. *Mol Reprod Dev*, 2002, 61: 234-248.
- [45] LONERGAN P, FAIR T, CORCORAN D, et al. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos[J]. *Theriogenology*, 2006, 65(1): 137-152.
- [46] AL-KATANANI Y M, DROST M, MONSON R L, et al. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions[J]. *Theriogenology*, 2002, 58(1): 171-182.
- [47] SCHMIDT M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle[J]. *AVS*, 2007, 49(Suppl. 1): S13.
- [48] IFTIKHAR A, ANJUM R H, USMANI M T, et al. Improvement of conception rate in crossbred cattle by using GnRH analogue therapy[J]. *Pak Vet J*, 2009, 29: 93-94.
- [49] BATAVANI R A, ELISI K. Effect of GnRH analogue(Gonadorelin) on pregnancy rates river buffaloes[J]. *Iran J Vet Res*, 2004, 5(2): 81-85.
- [50] BELTRAN M P, VASCONCELOS J L M. Conception rate in Holstein cows treated with GnRH or hCG on the fifth day post artificial insemination during summer[J]. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2008, 60(3): 580-586.
- [51] BROWN J L, REEVES J J. Absence of specific luteinizing hormone releasing hormone receptors in ovine, bovine and porcine ovaries[J]. *Boil Reprod*, 1983, 29: 1179-1182.
- [52] BARTOLOME J A, MELENDEZ P, KELBERT D, et al. Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination[J]. *Theriogenology*, 2005, 63(4): 1026-1037.