



体细胞克隆技术在乌金猪遗传资源保护上的应用

卯升义^{1,2}, 李卓^{1,2}, 奎华², 角德灵^{1,2}, 李钰莹^{1,2},

卿玉波^{1,3}, 郭建雄¹, 韦云芳^{1,2}, 魏红江^{1,3*}

(1. 云南省动物基因编辑与体细胞克隆技术重点实验室, 昆明 650201; 2. 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201; 3. 云南农业大学动物医学院, 昆明 650201)

摘要: 旨在通过猪体细胞克隆技术, 生产乌金猪火毛系, 并分析生长发育能力及繁殖性能, 为该技术在地方优良猪种保种上的应用提供理论依据。本研究采集了符合乌金猪种质特征的 3 头公猪和 12 头母猪的耳组织样品。公猪年龄分别为 3、6、11 月龄, 母猪年龄差距较大, 最小的 2 月龄, 最大的 10 岁。其中 3 头母猪和 1 头 3 月龄公猪已被去势, 10 岁母猪已无繁殖能力。结果, 成功建立了 15 头乌金猪的耳组织成纤维细胞系, 分别选择 1 头 3 月龄乌金猪(♂)和 10 岁乌金猪(♀)的成纤维细胞进行体细胞核移植, 经胚胎移植入 16 头代孕母猪, 共获得 25 头克隆猪, 克隆猪生长发育正常, 性成熟后进行自然交配共获得 39 头 F1 代活仔。本研究通过体细胞克隆技术成功克隆了乌金猪, 具备正常的生长发育性能和繁殖性能, 为地方猪种的保护研究提供了新的途径。

关键词: 乌金猪; 体细胞克隆技术; 生长性能; 繁殖性能

中图分类号: S828.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2020)09-2130-08

Application of Somatic Cell Cloning Technology in the Protection of Genetic Resources of Wujin Pigs

MAO Shengyi^{1,2}, LI Zhuo^{1,2}, KUI Hua², JIAO Deling^{1,2}, LI Yuying^{1,2},

QING Yubo^{1,3}, GUO Jianxiong¹, WEI Yunfang^{1,2}, WEI Hongjiang^{1,3*}

(1. Key Laboratory of Animal Gene Editing and Animal Cloning in Yunnan Province, Kunming 650201, China; 2. College of Animal Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 3. College of Veterinary Medicine, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The purpose of this experiment was to study the growth and developmental ability and reproductive performance of cloned Wujin pigs fire hair line by somatic cell cloning technology, and provide a theoretical basis for the application of somatic cell cloning technology in the conservation of local excellent pig breeds. In this study, the ear samples were collected from 3 male and 12 female pigs which met the characteristics of Wujin pigs. The 3 boars were 3, 6 and 11 months old, respectively. The sows had a large age gap, from 2 months old to 10 years old, the three sows and one boar of 3-month-old had been castrated and the sow of 10-year-old had no reproductive capacity. The ear fibroblast cell lines were successfully established from 15 Wujin pigs. Then the fibroblast cells from 3-month-old(♂) and 10-year-old(♀) pigs were used as donor cells for

收稿日期: 2020-02-18

基金项目: 云南省生物医药重大研发平台构建(2018ZF018); 云南省院士(专家)工作站(2018IC064)

作者简介: 卯升义(1993-), 男, 云南昭通人, 硕士生, 主要从事动物营养与饲料科学研究, E-mail: shengyim24@163.com; 李卓(1994-), 男, 湖南长沙人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: zhuoli2018@163.com. 卯升义与李卓为同等贡献作者

* 通信作者: 魏红江, 主要从事动物基因编辑与体细胞克隆技术研究, E-mail: hongjiangwei@126.com

somatic cell nuclear transfer. The cloned embryos were transplanted into 16 surrogate sows and 25 cloned pigs were obtained. The growth and development indexes of these cloned pigs were all normal. After sexual maturity, the male and female cloned pigs mated naturally and 39 live piglets (F1) were obtained. This study successfully cloned Wujin pigs by somatic cell nuclear transfer technology, and cloned Wujin pigs had normal growth and developmental ability and reproductive performance. The study result provides a new way for the conservation of local pig breeds.

Key words: Wujin pigs; somatic cell cloning technology; growth performance; reproductive performance

* **Corresponding author:** WEI Hongjiang, E-mail: hongjiangwei@126.com

乌金猪分布于云南、贵州及四川三省相邻的乌蒙山系和金沙江流域,被毛为黑色,少数为棕黄色(火毛系),头长且嘴筒粗而直,在额部多有“八卦”形皱纹且多旋毛^[1]。因其具有体质结实、体躯较窄、后肢发达、耐粗饲、抗逆性强、胴体瘦肉率高、肌间脂肪含量高等优点,2003 年被列为国家级珍贵保护品种^[2-3],是制作腊肉火腿的优质材料^[4]。由于生存环境不断恶化及猪肉需求日益增长,各地区大量引进外来优质猪种进行杂交改良,培育了大河乌猪^[5]、宣和猪^[6]等生产性能和繁殖性能优良的新品种,导致乌金猪原始品种的存栏量不断下降^[7-8]。目前,乌金猪(火毛系)品种在原乌金猪分布的云、贵、川境内都已罕见。

为保存乌金猪遗传资源,云南省建立了乌金猪保种场,并同时开展世代选育进行活体保种。但是,活体保种需维持一定的群体数量,饲养管理工作量大,维持保种的成本较高,且面临着动物疫病爆发、自然灾害侵袭的威胁,群体有效数量下降到一定水平后,还易受到遗传漂变、交配体制、近交系数等因素的制约^[9-11]。超低温冷冻保种可将精子、卵子、体细胞或胚胎置于 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液氮中长期保存,是目前广泛应用的动物保种方式^[12]。但猪射精量大、精子密度低、精液含水高,在温度急剧下降时易失去活力,导致精液冻存后存活率较低,复苏后精子活力较差^[13-15]。猪的胚胎又因胚胎脂质含量较高,低温耐受性差,增加了冷冻保存的难度^[16],因此,活体保种和生殖细胞保种仍存在应用缺陷,加之非洲猪瘟的区域性爆发,给我国地方猪种遗传资源的保护增加了巨大的压力,研究开发新型的猪遗传资源保护的方法和途径已迫在眉睫。

体细胞冷冻保存是最为常用的保种技术,该技术保种成本较低、复苏后细胞活力较高、保存年限较长,可以保存不同日龄、不同性别的种猪资源,与体细胞克隆技术结合后可快速恢复原有种猪资源群

体,高效地实现乌金猪遗传资源的保护,为地方猪种遗传资源的保护探索新的方法和途径。本课题组前期已通过体细胞克隆技术成功获得了版纳微型猪近交系克隆猪^[17],结合动物基因编辑技术获得了一系列基因修饰滇南小耳猪^[18-22],但克隆技术普遍面临着效率低的问题,克隆猪的生长性能及繁殖性能也备受关注,且采用体细胞克隆技术实现地方猪种的完整保存和复活的报道较少。

本研究在前期开展大量调查的基础上,选取去势或年龄较大的公、母乌金猪作为保种对象,建立耳组织成纤维细胞系,利用体细胞克隆技术获得克隆乌金猪公、母个体,并对克隆乌金猪的生长发育和繁殖性能指标进行监测和分析,综合评估猪体细胞克隆技术在地方猪种保护应用上的可行性,为优良地方猪种或濒危猪种的遗传资源保护提供新的保种途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料及试剂

耳组织样品采自云南省昭通市彝良县 15 头乌金猪火毛系,其中,3 头公猪,12 头母猪;猪卵巢采自云南省昆明市呈贡鸿腾屠宰场。

胎牛血清(FBS)以及 TCM-199 培养基购自 Gibco 公司;其它所用试剂及药品均购自 Sigma 公司。

1.2 耳组织采样及成纤维细胞建系培养

1.2.1 耳组织的采集 用手术刀片刮去耳缘周围的毛,75%酒精充分消毒处理后,灭菌超纯水冲洗,剪下约 1 cm^2 耳缘组织,放入含 5%双抗的 DMEM 培养液中,置于冰盒中带回实验室。

1.2.2 成纤维细胞系的分离及传代培养 用含 5%双抗的 PBS 溶液充分清洗耳组织样品,放入不含双抗的 PBS 溶液中清洗后将组织充分剪碎并移入 12.5 cm^2 细胞培养瓶中,加入 IV 型胶原酶溶液

(79% DMEM, 20% FBS, 1% 双抗, 0.1% 胶原蛋白酶), 放入培养箱中消化 2~4 h; 通过离心去除胶原酶溶液并收集细胞, 加入含 10% FBS、1% 双抗的细胞完全培养液, 放入 38 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 的培养箱中进行原代培养, 待细胞增殖至汇合度达到约 60% 时, 0.25% 胰蛋白酶消化, 一部分传代培养供体细胞核移植, 另一部分细胞冻存备用。

1.3 体细胞核移植及胚胎移植

1.3.1 卵母细胞成熟培养 猪卵巢用 37 °C 生理盐水清洗后保温, 4 h 内运回实验室。选取直径 3~8 mm 大小的卵泡, 注射器抽取卵丘-卵母细胞复合体(cumulus oocyte complexes, COCs), 用 TALP (Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium) 溶液清洗, 显微镜下用口吸针挑取 COCs。在含 0.1 mg · mL⁻¹ 丙酮酸、0.1 mg · mL⁻¹ L-半胱氨酸盐酸、10% 猪卵泡液、10 ng · mL⁻¹ EGF 的 TCM-199 成熟培养液滴中, 于 38.5 °C, 5% CO₂ 培养箱 (APC-30D, ASTEC, 日本) 中培养 38~42 h。

1.3.2 体细胞核移植 供体细胞在含 0.5% FBS 的培养液中饥饿处理 48 h 使其处于 G0/G1 期, 核移植开始前约 1 h 收集细胞备用。

0.1% 透明质酸消化 COCs, 挑取排出第一极体的成熟卵母细胞放入 NCSU23 预处理液(0.1 μg · mL⁻¹ 秋水仙胺、0.05 mol · L⁻¹ 蔗糖及 4 mg · mL⁻¹ 牛血清白蛋白) 中处理 0.5~1 h。在核移植操作液(10 μmol · L⁻¹ HEPES 和 0.3% 聚乙烯吡咯烷酮溶液, 含 0.1 μg · mL⁻¹ 秋水仙胺, 5 μg · mL⁻¹ 细胞松弛素 B 和 10% FBS) 中, 用显微注射针将第一极体及相邻胞质去除, 将供体细胞注射入卵周间隙。

1.3.3 电融合及电激活 在融合液(0.05 mmol · L⁻¹ Mg(C₂H₃O₂)₂, 0.25 mg · mL⁻¹ D-山梨醇, 20 mg · mL⁻¹ BSA 和 0.5 mmol · L⁻¹ HEPES) 中, 用电融合仪(ET3, FUJIHIRA, 日本) 将去核卵母细胞和供体细胞融合, 设定参数(脉冲电压 25 V · mm⁻¹, 脉冲持续时间 20 μs, 脉冲次数 1 次)。结束后移入 PZM3 培养液中平衡 2 h。

在激活液(0.25 mol · L⁻¹ D-山梨醇, 0.05 mmol · L⁻¹ Mg(C₂H₃O₂)₂, 0.01 mmol · L⁻¹ Ca(C₂H₃O₂)₂, 0.1 mg · mL⁻¹ BSA) 中对融合后重构胚进行电激活, 设定参数(脉冲电压 150 V · mm⁻¹, 脉冲持续时间 100 μs, 脉冲次数 1 次)。结束后移入 5 μg · mL⁻¹ CB 的 PZM3 中, 置于 38.5 °C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 的培养箱中平衡 2 h 后移入 PZM3 培

养液中进行体外培养。

1.3.4 胚胎移植 选用 6 头三元杂交母猪(杜洛克♂ × (长白♂ × 大白♀)), 8 头滇南小耳母猪, 1 头滇杜杂交母猪(杜洛克♂ × 滇南小耳猪♀) 作为胚胎移植的代孕母猪, 在发情期筛选体况中上等母猪进行胚胎移植手术, 将克隆胚胎移植入母猪输卵管内。胚胎移植 30 d 后对代孕母猪进行 B 超(HS-101V, Honda Electronics Co. Ltd., Yamazuki, Japan) 诊断, 记录代孕母猪妊娠与仔猪出生情况。

1.4 克隆乌金猪生长发育性能检测

对 6、7 月龄 12 头克隆猪进行体重测量, 早晨空腹, 逐头装于猪笼内称重。使用测杖进行体高、胸宽、胸深、臀宽、前额宽测量, 使用皮尺进行体长、头长、胸围、腹围、臀围、尾长、尾围、管围的测量, 测量方法参见文献[23]。

1.5 乌金猪繁殖性能检测

母猪生长至 5 月龄开始查情, 选择 7 头克隆母乌金猪(♀) 在发情期与 4 头克隆公乌金猪(♂) 进行自然配种, 同一头公猪间隔 8~12 h 后再次配种, 其中, 1207 号公乌金猪配种未成功, 30 d 后进行 B 超诊断, 记录克隆母猪的妊娠与仔猪的出生情况。

2 结果

2.1 乌金猪火毛系品种现状调查及样品采集

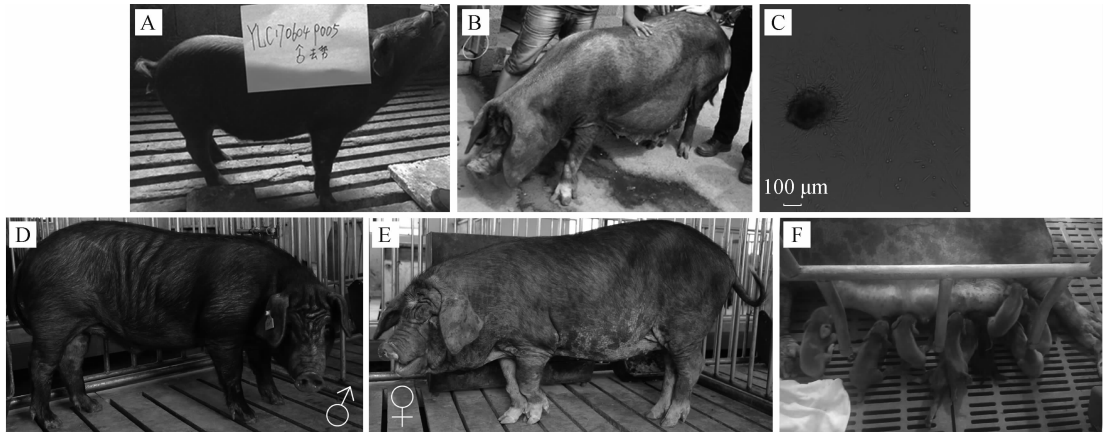
研究组在彝良县经 18 个月先后 5 次现场调查, 遍及龙安乡、小草坝、龙海乡、牛街乡、龙街苗族彝族乡、奎香苗族彝族乡、树林彝族苗族乡 7 个乡镇, 走访农户及养殖户共 12 户, 找到火毛猪近 100 头, 其中大多为杜洛克杂交后代, 而符合乌金猪火毛系特征的仅有 3 头公猪和 12 头母猪(图 1A、1B)。公猪年龄分别为 3、6、11 月龄, 其中 3 月龄个体被去势; 母猪年龄差距较大, 最小的 2 月龄, 最大的 10 岁, 其中 3 头母猪被去势, 10 岁母猪已无繁殖能力, 研究组成员对 15 头乌金猪进行耳组织取样, 成功建立了乌金猪耳组织成纤维细胞系(图 1C), 并冷冻保存原代和 1 代细胞共 131 管备用(表 1)。

2.2 乌金猪体细胞克隆和胚胎移植

以 3 月龄去势公乌金猪耳组织(YLC170604P005) 成纤维细胞系作为供体细胞构建了 1 995 枚克隆胚, 将克隆胚胎移植入 8 头代孕母猪中, 胚胎移植 30 d 后经 B 超诊断 7 头妊娠, 妊娠率 87.5%, 4 头分娩, 分娩率 50.0%, 共获得 11 头克隆仔猪, 单胎最高 3 头; 以 10 岁成年母猪耳组织(YLC170604P024) 成

纤维细胞系为供体细胞构建了 2 470 枚克隆胚,体外分别培养 3 和 7 d,均可正常卵裂并发育至囊胚,共移植 8 头代孕母猪,胚胎移植 30 d 后经 B 超诊断

5 头妊娠,妊娠率 62.5%,4 头分娩,分娩率 50.0%,共获得 14 头克隆仔猪,单胎最高出生 5 头(表 2)。



A. 去势的乌金猪个体(♂); B. 失去繁殖能力的乌金猪个体(♀); C. 乌金猪成纤维细胞系; D. 克隆乌金猪个体(♂); E. 克隆乌金猪个体(♀); F. 克隆乌金猪繁殖的部分后代
A. Castrated Wujin pig (♂); B. Wujin pig losing reproductive capacity (♀); C. Wujin pigs fibroblast cells; D. Cloned Wujin pig (♂); E. Cloned Wujin pig (♀); F. Partial breeding offspring of cloned Wujin pigs

图 1 克隆乌金猪个体及交配繁殖后代

Fig. 1 Cloned Wujin pigs and their breeding offspring

表 1 乌金猪耳组织成纤维细胞遗传资源保存情况

Table 1 The statistics of ear fibroblast cell conservation of Wujin pigs

采样猪编号 Sample No.	性别 Sex	年龄 Age	冻存管数/管 No. of frozen cell	
			原代 Primary cell	1 代 Generation 1
YLC170604P001	♂	11 月龄	4	4
YLC170604P002	♀	11 月龄	4	4
YLC170604P003	♂	6 月龄	4	4
YLC170604P005	♂(去势)	3 月龄	6	3
YLC170604P002	♀	11 月龄	4	4
YLC170604P004	♀	11 月龄	4	4
YLC170604P008	♀	11 月龄	6	4
YLC170604P010	♀(去势)	2.5 月龄	6	4
YLC170604P012	♀(去势)	2.5 月龄	6	4
YLC170604P014	♀(去势)	2.5 月龄	4	4
YLC170604P016	♀	4 月龄	6	4
YLC170604P018	♀	12 月龄	4	4
YLC170604P020	♀	12 月龄	4	4
YLC170604P022	♀	3 月龄	4	4
YLC170604P024	♀	10 岁	6	4

n=15

131

表 2 乌金猪体细胞克隆胚胎移植情况统计

Table 2 The statistics of somatic cell clone embryo transfer of Wujin pigs

供体细胞 Donor cell	胚胎移植数/枚 No. of transferred embryos	代孕母猪数/头 No. of surrogate sows	30 d 妊娠母猪数/头 No. of pregnancy pigs on 30 d	分娩数/头 No. of deliveries	产仔数/头 No. of piglets
YLC170604P005	1 995	8	7	4	11
YLC170604P024	2 470	8	5	4	14

2.3 克隆乌金猪生长发育检测

为分析乌金猪火毛系克隆个体(图 1E、1F)的生长发育情况,分别在 6、7 和 8 月龄对 4 头克隆公猪和 8 头克隆母猪进行体重和体尺的测定(表 3),结果表明,克隆猪个体生长发育状态正常,母猪较公猪体型更大,生长速度更快。

2.4 乌金猪火毛系克隆个体及后代的繁殖

7 头参与配种的克隆母乌金猪均成功妊娠,6 头母猪产下 F1 代仔猪共 49 头,1 头产下 5 头木乃伊胎。其中,活仔 39 头,25 头母猪,14 头公猪,平均总产仔数为(8.17±4.22)头,平均产活仔数为(7.80±3.27)头,平均断奶仔猪数为(5.80±1.79)头,平均初生窝重为(6.05±2.16) kg。F1 代仔猪生长至 7 月龄,母乌金猪(耳号:8006W2,♀)在发情期与公乌金猪(耳号:8006W1,♂)进行自然交配,妊娠并成功分娩 F2 代仔猪 5 头,成活 5 头,3 头公猪,2 头母猪,平均初生重为(0.73±0.1) kg(表 4,图 1G)。结果表明,克隆乌金猪及后代均具有正常繁殖能力。

3 讨论

3.1 猪体细胞克隆技术在地方猪种保护的应用比较

乌金猪因具有肉质好的特性,是制作宣威火腿的重要原材料,对其生长性能、遗传繁育性能及种质资源保护方面的研究也逐渐增多。因地理、气候及人文的种种差异,致使乌金猪的保护与开发利用途径不一致,在乌金猪分布的云南、四川、贵州等地区,主要通过建设乌金猪(大河猪)原产地保种场(区)或以农户保种为主,保种方式较为单一,保种场经济效益较低、成本高,维持长期保种的难度大^[24],此外,活体保种存在非洲猪瘟等重大动物疫病爆发等不可控的缺陷。在当前国内非洲猪瘟大爆发流行且缺乏特效药和疫苗的背景下,若只以单一的活体保种对地方猪种进行保护,一旦感染非洲猪瘟疫情,极其可

能导致群体灭绝,永久失去宝贵种质资源,损失不可估量,因此,开展细胞冷冻等保种策略,作为活体保护的重要补充方式,对于应对非洲猪瘟疫情威胁、降低种猪资源灭绝风险具有重要现实意义和长远战略意义^[25]。猪精子冷冻保存技术目前也尚未成熟,且只能针对公猪进行保种,冷冻后精子活力低,推广应用范围较为局限,Wongtawan 等^[26]报道,猪精液分别用 0.5 mL 细管和 2.8 mL 多聚平管(4 个 0.7 mL 平管组成)冷冻,冻后精子活力仅为 42.8% 和 44.3%。猪胚胎因其脂肪含量较高,致使猪胚胎冷冻保存的技术难度增大。本试验通过建立 15 头乌金猪火毛系体细胞系并进行冷冻保存共 131 管(10^6 个·mL⁻¹),复苏后细胞成活率≥90%,远远高于精子冷冻的成活率(一般<50%),本研究进一步通过体细胞克隆技术分别获得去势的 3 月龄公乌金猪和失去繁殖能力的 10 岁母乌金猪克隆重构胚胎 1 995(♂)和 2 470 枚(♀),各移植 8 头代孕母猪,成功生下公、母仔猪各 11 头和 14 头,与所报道的精子冷冻及胚胎冷冻相比,体细胞克隆技术高效地实现了地方乌金猪种的保护和复活,同时,通过该技术也成功实现了地方家畜优良品种的培育和快速扩繁^[27]。

3.2 体细胞克隆技术对乌金猪生长发育性能及繁殖性能的影响

因云南具有独特的地理、气候环境及人文习俗,地方猪种种质资源较为丰富,各品种间生长发育性能和繁殖性能存在较大的差异。郭海涛等^[1]测定了云南省威信县 10~13 月龄的健康乌金猪 30 头(均为阉猪),其平均体高为 53.7 cm,平均体长为 94.6 cm,平均胸围为 83.6 cm,平均体重为 48.2 kg。与本研究 8 月龄克隆乌金猪的平均体高(60.80±2.10) cm(♂)和(60.4±4.20) cm(♀)相差不大,但胸围和体重与本研究获得的克隆乌金猪胸围(95.60±5.30) cm(♂)、(104.00±12.60) cm(♀)及体重(70.50±9.70) kg(♂)、(90.20±23.60) kg(♀)相比,克隆乌金猪的

胸围和体重增重更快,表明克隆乌金猪与自然繁殖乌金猪相比,克隆乌金猪也能获得正常的生长发育能力。本研究分别选择已去势的 3 月龄公乌金猪与 10 岁已无繁殖能力的母乌金猪为供体进行体细胞克隆,共获得 11 头克隆公乌金猪和 14 头克隆母乌金猪,各选择 4 头公猪与 7 头母猪进行自然交配,获

得 49 头 F1 代仔猪,F1 代初产仔数平均为 (8.17 ± 4.22) 头,与鲁绍雄等^[6]所报道的乌金猪初产仔数为 (8.54 ± 3.04) 头的结果基本相一致。本研究获得的克隆猪自然交配 F1 代平均初生重为 (0.79 ± 0.12) kg,与尤如华和余宗寿^[7]报道的乌金猪平均初生重为 0.96 kg 结果相差不大,这表明,已去势的公猪或已失

表 3 不同月龄乌金猪克隆个体生长指标统计

Table 3 The growth indexes of cloned Wujin pigs with different month ages

生长指标 Growth index	6 月龄 6-month-old		7 月龄 7-month-old		8 月龄 8-month-old		每个月 增长速度 Growth rate per month
	公猪 Boar	母猪 Sow	公猪 Boar	母猪 Sow	公猪 Boar	母猪 Sow	
	体重/kg Body weight	53.89±3.39	65.48±16.25	60.5±5.90	79.80±20.70	70.50±9.70	
体长/cm Body length	98.25±1.85	107.25±10.08	98.00±4.20	110.30±10.30	103.30±3.20	114.70±10.80	3.33
体高/cm Body height	53.75±2.66	55.31±3.95	57.30±3.00	57.60±4.60	60.80±2.10	60.40±4.20	2.86
胸宽/cm Chest width	26.75±1.55	23.90±2.97	26.00±1.40	25.90±3.80	30.80±1.80	28.30±3.60	2.12
胸深/cm Chest depth	30.63±0.95	33.69±3.93	31.10±0.80	35.40±4.80	35.50±1.70	38.90±4.20	2.54
胸围/cm Chest circumference	89.00±4.55	92.56±10.17	89.30±4.10	97.80±10.90	95.60±5.30	104.00±12.60	4.90
腹围/cm Abdominal circumference	85.50±4.43	99.69±13.90	87.30±5.20	102.70±10.50	95.20±7.60	110.30±16.80	5.14
臀围/cm Hip circumference	78.50±4.12	75.63±10.82	78.00±5.40	70.00±8.60	85.70±2.20	87.80±8.60	5.25
臀宽/cm Hindquarter width	22.38±1.55	23.18±3.65	22.30±2.00	23.90±3.00	27.30±4.00	25.40±3.60	1.55
头长/cm Head length	21.75±0.65	20.19±0.59	22.40±1.80	20.60±1.70	23.00±0.00	22.30±1.20	0.93
额宽/cm Frontal width	11.13±1.11	10.75±0.65	11.80±0.30	12.10±1.30	12.40±0.30	13.10±1.30	0.98
尾长/cm Tail length	24.63±2.29	29.56±2.15	25.10±1.40	30.90±1.70	26.60±0.30	32.70±1.30	1.37
尾围/cm Tail circumference	10.13±0.25	10.44±0.98	10.10±0.50	10.50±0.90	10.20±0.20	11.50±1.20	0.35
管围/cm Vessel length	14.38±0.25	14.88±1.25	14.50±0.60	16.10±1.40	15.10±0.20	16.60±1.30	0.71

所测数据用“平均数±标准差”表示

All the data were showed as “mean±SD”

表 4 克隆乌金猪繁殖性能

Table 4 The reproductive performance of cloned Wujin sows

代数 Generation	公猪耳号 Ear No. of male	母猪耳号 Ear No. of female	胎次 Parity	总产仔数/头 No. of total piglets	产活仔数/头 No. of alive piglets	断奶仔猪数/头 No. of weaned piglets	初生窝重/kg Birth litter weight	断奶窝重/kg Weaned litter weight	
F1	1206	1102	1	9	7	6	5.35	22.78(30天)	
	1203	1104	1	11	8	6	5.68	27.52(39天)	
		1108	1	5头木乃伊胎					
		1107	1	13	12	6	8.41	33.40(33天)	
		1101	1	10	9	8	7.82	38.34(30天)	
	1202	1105	1	3头死胎、 4头木乃伊胎					
			1103	1	3	3	3	3.00	31.72(38天)
	平均	—	—	8.17±4.22	7.80±3.27	5.80±1.79	6.05±2.16	—	
F2	8006W1	8006W2	1	5	5	3		3.66	

去繁殖能力的母猪通过体细胞克隆技术能获得具有正常生长发育能力和繁殖性能的个体,且克隆猪自然交配后能获得生长发育良好的 F1 代个体,表明体细胞克隆技术可使无繁殖能力的地方优良品种猪个体恢复繁殖性能并正常生长发育,是实现濒危灭绝乌金猪等优质地方品种遗传资源种群扩繁及保护的有效途径。

4 结 论

本研究成功分离了不同年龄、性别(包括已去势公猪和失去繁殖能力母猪)共 15 头乌金猪的成纤维细胞,并进行传代培养及冻存,实现了乌金猪遗传资源的长期保存,进一步利用体细胞克隆技术分别构建了公、母乌金猪克隆胚胎各 1 995 和 2 470 枚,共移植 16 头代孕母猪后获得 25 头克隆乌金猪,克隆乌金猪生长发育正常,性成熟后进行交配繁殖获得 39 头 F1 代活仔,并能正常生长发育。本研究通过体细胞克隆技术成功实现了地方优良猪种的保种和扩繁,且克隆的乌金猪火毛系具备正常的生长发育和繁殖性能,表明体细胞克隆技术可为地方猪种的保护和应用提供新的途径。

参考文献(References):

[1] 郭海涛,郭成裕,李军鹏,等.我国地方猪品种—乌金猪的生理特性研究[J].现代畜牧兽医,2008(10):17-18.
GUO H T, GUO C Y, LI J P, et al. Studies on physiological characteristics of Wujin pig in domestic local

pig breeds[J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2008(10): 17-18. (in Chinese)

- [2] 王 冶,郭荣富.乌金猪研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2017(10):90-92.
WANG Y, GUO R F. Recent advances of Wujin pig [J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017(10):90-92. (in Chinese)
- [3] 雷怀刚,杨润林,沈 静,等.乌金猪(凉山猪)种质特性概述[J].中国猪业,2013,8(S1):149-150.
LEI H G, YANG R L, SHEN J, et al. Characteristic of Wujin (Liangshan) pig[J]. *China Swine Industry*, 2013,8(S1):149-150. (in Chinese)
- [4] 国家畜禽遗传资源委员会.中国畜禽遗传资源志—猪志[M].北京:中国农业出版社,2011.
China National Commission of Animal Genetic Resources. *Animal genetic resources in China-Pigs*[M]. Beijing:China Agriculture Press, 2011. (in Chinese)
- [5] 王忠庆,荣耀先.大河乌猪与大河猪(乌金猪)肉质性状研究[J].云南农业科技,2004(S1):41-44.
WANG Z Q, RONG Y X. Study on the meat characteristics of Dahe Swine (Wujin Swine) [J]. *Yunnan Agricultural Science and Technology*, 2004(S1):41-44. (in Chinese)
- [6] 鲁绍雄,连林生,李庆科,等.基于乌金猪深度发掘的优质高效新品种选育[J].猪业科学,2016,33(12):120-122.
LU S X, LIAN L S, LI Q K, et al. Breeding of new variety based on Wujin pig[J]. *Swine Industry Science*, 2016, 33(12): 120-122. (in Chinese)
- [7] 尤如华,余宗寿.乌金猪保种选育与开发利用研究进展[J].中国猪业,2013,8(S1):173-174.

- YOU R H, YU Z S. Research progress on maintenance, selection and development of Wujin pig resources[J]. *China Swine Industry*, 2013, 8(S1): 173-174. (in Chinese)
- [8] 黄卫平, 王强, 黄剑锋, 等. 乌金猪品种资源及开发现状[J]. *四川畜牧兽医*, 2017, 44(3): 42-43.
- HUANG W P, WANG Q, HUANG J F, et al. Current status and development of Wujin pig resources[J]. *Sichuan Animal & Veterinary Sciences*, 2017, 44(3): 42-43. (in Chinese)
- [9] 阎景娟, 马月辉, 道尔吉. 浅析畜禽活体保种的影响因素[J]. *动物科学与动物医学*, 2003, 20(5): 63-65.
- YAN J J, MA Y H, DAO E J. The factors livestock living bodies conservation[J]. *Animal Science & Veterinary Medicine*, 2003, 20(5): 63-65. (in Chinese)
- [10] 甘麦邻, 杨露, 蒲红州, 等. 畜禽保种理论与方法在猪保种工作中的应用[J]. *猪业科学*, 2017, 34(3): 127-130.
- GAN M L, YANG L, PU H Z, et al. The application of theory and method for livestock conservation in pig[J]. *Swine Industry Science*, 2017, 34(3): 127-130. (in Chinese)
- [11] 鲁立刚, 鲁绍雄. 影响家畜原位保种效果的主要因素研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2009(5): 45-47.
- LU L G, LU S X. Study on the major factors in situ conservation of domestic animals[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2009(5): 45-47. (in Chinese)
- [12] JOHNSON L A, WEITZE K F, FISER P, et al. Storage of boar semen[J]. *Anim Reprod Sci*, 2000, 62(1-3): 143-172.
- [13] PARKS J E. Hypothermia and mammalian gametes [M]. San Diego: Academic Press, 1997: 229-261.
- [14] 朱士恩. 猪精液冷冻技术研究[J]. *猪业科学*, 2007, 24(5): 44-47.
- ZHU S E. Technology of freezing pig semen[J]. *Swine Industry Science*, 2007, 24(5): 44-47. (in Chinese)
- [15] PEZO F, ROMERO F, ZAMBRANO F, et al. Preservation of boar semen: an update[J]. *Reprod Domest Anim*, 2019, 54(3): 423-434.
- [16] ZHANG W, YI K L, YAN H F, et al. Advances on *in vitro* production and cryopreservation of porcine embryos[J]. *Anim Reprod Sci*, 2012, 132(3-4): 115-122.
- [17] 叶雷, 李红, 魏红江, 等. 成年版纳微型猪近交系克隆猪的制备[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(9): 1491-1498.
- YE L, LI H, WEI H J, et al. Production of cloning adult Banna miniature inbred pig[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(9): 1491-1498. (in Chinese)
- [18] YU H H, ZHAO H, QING Y B, et al. Porcine zygote injection with Cas9/sgRNA results in DMD-modified pig with muscle dystrophy[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(10): 1668.
- [19] CHENG W M, ZHAO H, YU H H, et al. Efficient generation of GGTA1-null *Diannan* miniature pigs using TALENs combined with somatic cell nuclear transfer [J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2016, 14(1): 77.
- [20] SHEN Y F, XU K X, YUAN Z M, et al. Efficient generation of P53 biallelic knockout *Diannan* miniature pigs via TALENs and somatic cell nuclear transfer[J]. *J Transl Med*, 2017, 15(1): 224.
- [21] YU H H, LONG W H, ZHANG X Z, et al. Generation of *GHR*-modified pigs as Laron syndrome models via a dual-sgRNAs/Cas9 system and somatic cell nuclear transfer[J]. *J Transl Med*, 2018, 16(1): 41.
- [22] NIU D, WEI H J, LIN L, et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9 [J]. *Science*, 2017, 357(6357): 1303-1307.
- [23] 甘丽娜, 钦伟云, 杨建生, 等. 不同月龄中梅山猪体尺体质量及其生长增量的测定分析[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(13): 133-135.
- GAN L N, QIN W Y, YANG J S, et al. Measurement and analysis of body size and growth increment of Meishan pig in different months[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(13): 133-135. (in Chinese)
- [24] LEIBO S P, SZTEIN J M. Cryopreservation of mammalian embryos: Derivation of a method[J]. *Cryobiology*, 2019, 86: 1-9.
- [25] 王献伟. 非洲猪瘟背景下种猪资源生物保种策略研究[J]. *河南畜牧兽医*, 2019, 40(10): 5-6.
- WANG X W. Study on biological conservation strategy of swine resources in the context of African swine fever [J]. *Henan Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019, 40(10): 5-6. (in Chinese)
- [26] WONGTAWAN T, SARAVIA F, WALLGREN M. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses [J]. *Theriogenology*, 2006, 65(4): 773-787.
- [27] 魏红江, 王文, 卿玉波, 等. 一种利用体细胞克隆技术培育地方优良家畜品种的方法 [P]. CN106755112B, 2019-07-12.
- WEI H J, WANG W, QING Y B, et al. Method for cultivating excellent local livestock breeds using somatic cell cloning technology [P]. CN106755112B, 2019-07-12. (in Chinese)