

核心群奶牛超数排卵技术影响因素的研究

郝海生, 赵善江, 杜卫华, 赵学明, 庞云渭, 邹惠影, 宋金辉, 朱化彬

(中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193)

摘要: [目的]为进一步研究核心群奶牛超数排卵技术影响因素。[方法]试验使用3个FSH剂量和4个公牛精液对27头青年奶牛进行超数排卵。对供体牛胚胎生产情况和受体胚胎移植妊娠率进行统计。[结果]结果显示,供体2次超排获得7.8枚平均可用胚胎显著高于1次超排获得的5.7枚平均可用胚胎($P < 0.05$);260,280 mg FSH超排供体获得6.0和7.7枚平均可用胚胎显著高于300 mg FSH超排供体获得的4.6枚平均可用胚胎($P < 0.05$);供体使用4个公牛精液人工授精后获得的平均可用胚胎数和平均未受精卵数差异不显著($P > 0.05$);移植前接种疫苗的受体胚胎移植妊娠率显著降低($P < 0.05$)。[结论]核心群奶牛超排适宜FSH剂量为260~280 mg,使用高受精力公牛精液和对超排反应好的供体重复超排能够提高超排效率,受体移植前避免疫苗接种能够提高胚胎移植妊娠率。

关键词: 奶牛; 超数排卵; FSH; 精液; 胚胎移植

中图分类号: S823 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-9111(2022)05-0017-05

自《中国奶牛群体遗传改良计划(2008-2021)》实施以来,我国奶牛育种体系建设快速发展,初步建立了我国奶牛遗传评估技术平台。据统计,到2019年末9家奶牛核心育种场奶牛核心群母牛存栏5 816头^[1]。与此同时,由于国家奶牛核心育种场建设刚刚起步,核心群母牛还存在着生产水平和遗传品质有待提高,顶级母牛数量偏少的问题,因此迫切需要利用超数排卵、胚胎移植等先进繁育技术,提高良种扩繁效率,扩大核心群母牛数量。

超数排卵技术是优秀奶牛快速扩繁的重要技术手段^[2]。据国际胚胎移植协会统计,2018年世界范围共超排供体母牛76 076万头,获得可用胚胎469 967万枚^[3]。在实际生产中,供体牛类型、超排次数以及激素剂量等都能够影响供体超排效果^[4-8]。本研究通过对核心群奶牛进行超数排卵,研究FSH剂量、精液质量和超排次数对超数排卵效果的影响,期望能够为核心育种场核心群奶牛超数排卵和胚胎移植技术的应用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 供体选择

选择27头13~14月龄核心群奶牛作为供体。所有供体发情周期正常,经直肠检查生殖器官正常,健康无繁殖疾病。供体牛由甘肃某国家核心育种场提供。试验时间为2019年8—9月。

1.2 试验材料

促卵泡素(FSH,400 mg NIH/瓶)、孕酮阴道栓(CIDR,1.56 g孕酮/支)、保存液、冲胚液均购自威龙公司;前列腺素(PG,0.322 mg/2 mL)购自齐鲁动物保健品公司;采胚管(规格:15#)购自Minitube公司;集卵杯购自日本FHK公司。

1.3 试验方法

1.3.1 供体超排处理 所有供体在发情周期任意1天埋植CIDR(第0天),CIDR埋植后第5天开始超排处理。供体母牛采用4天8次,每次间隔12 h,剂量递减方法肌肉注射FSH进行超排处理,FSH注射总剂量分别为260,280,300 mg。第7天注射FSH同时

收稿日期:2022-06-10 修回日期:2022-06-20

基金项目:国家现代农业产业技术体系项目(CARS36);中国农业科学院科技创新工程协同创新任务项目(CAAS-XTCX2016011-01-07)

作者简介:郝海生(1977—),男,硕士,助理研究员,主要从事家畜繁殖技术研究。

* 通讯作者:朱化彬(1965—),男,博士,研究员,博士生导师,主要从事家畜胚胎工程与繁殖技术研究。

各肌肉注射 PG 4.0 mL,并撤除 CIDR。第 9 天早晚观察供体发情,供体发情后 12 h 进行第 1 次人工授精,24 h 后进行第 2 次人工授精。每次人工授精使用量为 1 支冷冻细管精液,输精部位为子宫体前端。

1.3.2 胚胎回收与鉴定 人工授精后第 7 天采用非手术方法回收胚胎。麻醉方法采用尾椎硬膜外腔注射 5~7 mL 利多卡因,待尾部松弛后进行冲胚。选择 15[#] Minitub 采胚管回收胚胎,每侧子宫角使用 150~200 mL 冲胚液,胚胎回收后肌肉注射 PG 4.0 mL。回收胚胎收集在集卵杯中,使用体视显微镜进行检胚。根据形态学标准,回收胚胎分为可用胚胎(A、B 级胚胎)、退化胚胎和未受精卵。

1.3.3 胚胎移植与妊娠诊断 选择自然发情 7 d 后经直肠检查存在新生黄体的 13~14 月龄奶牛为受体,对新鲜 A 级和 B 级胚胎进行移植。移植 30 d 后,采用 B 超方法对受体进行早期妊娠诊断。

1.4 测定指标

1.4.1 不同超排次数对核心群奶牛超数排卵的影响 超排处理的供体进行 1~2 次超排处理,收集胚胎后统计供体胚胎生产情况,包括胚胎总数、可用胚胎数、退化胚胎数和未受精卵数及平均可用胚胎数、

平均退化胚胎数和平均未受精卵数。

1.4.2 不同 FSH 剂量对核心群奶牛超数排卵的影响

使用 3 种不同剂量 FSH 对供体进行超排处理,收集胚胎后统计供体胚胎生产情况,包括胚胎总数、可用胚胎数、退化胚胎数和未受精卵数及平均可用胚胎数、平均退化胚胎数和平均未受精卵数。

1.4.3 不同公牛精液对核心群奶牛超数排卵的影响

超排处理的供体使用 4 个公牛精液进行人工授精,收集胚胎后统计供体胚胎生产情况,包括胚胎总数、可用胚胎数、退化胚胎数和未受精卵数及平均可用胚胎数、平均退化胚胎数和平均未受精卵数。

1.5 统计与分析

使用 SPSS 软件对数据进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异显著,结果用“平均值 + 标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 核心群奶牛胚胎生产情况

由表 1 可知,核心群奶牛超排 35 头次,获得平均可用胚胎 6.70 枚,平均退化胚胎 1.00 枚,平均未受精卵 1.00 枚。

表 1 核心群奶牛胚胎生产结果

供体数 /头次	胚胎总数 /枚	可用胚胎数 /枚	平均可用胚胎 数/枚	退化胚胎数 /枚	平均退化胚胎 数/枚	未受精卵数 /枚	平均未受精卵 数/枚
35	306	234	6.70	36	1.00	36	1.00

2.2 不同超排次数胚胎生产情况

由表 2 可知,供体牛 2 次超排平均可用胚胎数和平均未受精卵数显著高于供体牛 1 次超排获得的

平均可用胚胎数和平均未受精卵数($P < 0.05$);平均退化胚胎数差异不显著($P > 0.05$)。

表 2 不同超排次数胚胎生产结果

次数	供体数 /头次	可用胚胎数 /枚	平均可用胚胎数 /枚	平均退化胚胎数 /枚	平均未受精卵数 /枚
1	19	109	5.70 ± 0.91 ^a	1.10 ± 0.22 ^a	0.40 ± 0.17 ^a
2	8	125	7.80 ± 0.95 ^b	1.00 ± 0.20 ^a	1.40 ± 0.48 ^b

注:同列数据肩标小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),小写字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。

2.3 不同 FSH 剂量胚胎生产情况

由表 3 可知,260,280 mg FSH 超排供体牛获得的平均可用胚胎数和平均退化胚胎数显著高于 300 mg FSH 超排供体牛获得的平均可用胚胎数和平均退化胚胎数($P < 0.05$);3 个 FSH 剂量超排供体获

得的平均未受精卵数差异不显著($P > 0.05$)。

2.4 使用不同公牛精液人工授精胚胎生产情况

由表 4 可知,供体牛使用 4 种公牛精液人工授精后获得的平均可用胚胎数、平均未受精卵数、平均退化胚胎数差异均不显著($P > 0.05$)。

表 3 不同 FSH 剂量胚胎生产结果

FSH 剂量 /mg	供体数 /头次	胚胎总数 /枚	可用胚胎数 /枚	平均可用胚胎 数/枚	平均退化胚胎 数/枚	平均未受精卵 数/枚
260	14	112	84	6.00 ± 1.18 ^a	1.30 ± 0.32 ^a	0.70 ± 0.22 ^a
280	16	163	123	7.70 ± 0.90 ^a	1.20 ± 0.23 ^a	1.30 ± 0.41 ^a
300	5	31	23	4.60 ± 1.29 ^b	0.60 ± 0.24 ^b	1.00 ± 1.00 ^a

注:同列数据肩标小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),小写字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。

表 4 不同公牛精液人工授精胚胎生产结果

精液	供体数 /头次	胚胎总数 /枚	可用胚胎数 /枚	平均可用胚胎数 /枚	平均退化胚胎数 /枚	平均未受精卵数 /枚
HO12286	12	121	90	7.50 ± 1.30 ^a	1.60 ± 0.33 ^a	1.00 ± 0.43 ^a
HO12157	6	53	41	6.80 ± 1.56 ^a	1.00 ± 0.33 ^a	1.30 ± 0.33 ^a
HO18693	5	46	35	7.00 ± 1.92 ^a	1.20 ± 0.37 ^a	1.00 ± 0.32 ^a
HO12124	6	52	38	6.30 ± 1.56 ^a	1.30 ± 0.42 ^a	1.00 ± 0.82 ^a

注:同列数据肩标小写字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。

2.5 新鲜胚胎移植结果

由表 5 可知,第 1,第 2 和第 3 批次受体新鲜胚胎移植妊娠率显著高于第 4 批次受体新鲜胚胎移植妊娠率($P < 0.05$)。

表 5 新鲜胚胎移植结果

批次	受体数/头次	妊娠牛数/头	妊娠率/%
1	45	31	68.89 ^a
2	52	34	65.39 ^a
3	25	16	64.00 ^a
4	22	10	45.46 ^b
合计	144	91	63.19

注:同列数据肩标小写字母不同表示差异显著($P < 0.05$),小写字母相同表示差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨 论

3.1 核心群奶牛超排效果比较

目前,国内外奶牛超排后获得的平均可用胚胎数主要在 5.5 ~ 6.5 枚之间^[9-12]。本研究核心群奶牛超排有效率达到 100%,头均获 6.7 枚可用胚胎,高于武浩楠等^[9],安志兴等^[10],巴特尔等^[11]和 J. C. Silva 等^[12]奶牛超排获得的 5.6 枚、5.75 枚、5.9 枚和 6.4 枚平均可用胚胎,也高于国际胚胎移植协会统计的 2018 年世界范围内奶牛超排获得 6.2 枚平均可用胚胎^[3],略低于刘宜存等^[13]奶牛超排获得的 7.0 枚平均可用胚胎,表明核心群奶牛第 1 次配种前进行超数排卵能够获得满意的超排效果,同时也能够减少超排处理对牧场正常配种计划的影响。本研究对部分超排反应好的供体进行了二次超排处

理,二次超排有效率也达到 100%,二次超排的供体牛获得 7.8 枚平均可用胚胎,平均可用胚胎数显著增加,这一结果与毕江华等^[14]的研究结论一致,表明核心群奶牛二次超排能够增加可用胚胎数量。

3.2 FSH 剂量对超排效果的影响

外周循环血液中维持一定浓度 FSH 是诱发卵巢多个卵泡发育成熟并排卵的前提^[15-16],同时供体牛注射 FSH 总剂量也应根据供体牛品种和体重进行适当的增减^[17-18],比如青年供体牛体重小于经产供体牛体重,超排时应适当减少 FSH 剂量。安志兴等^[5]研究表明低剂量 FSH 超排青年奶牛比高剂量 FSH 超排青年奶牛可增加平均可用胚胎 1.5 枚。Souza 等^[19]研究也表明 200 mg FSH 超排青年奶牛比 400 mg FSH 超排青年奶牛可增加平均可用胚胎 1.0 枚。本研究结果与上述结论一致,260 mg 和 280 mg FSH 超排效果好于 300 mg FSH 超排效果,供体牛平均可用胚胎数显著增多。研究中也发现随着 FSH 剂量增加供体获得胚胎中的未受精卵数量增多,这可能是由于高剂量 FSH 会引起卵泡排卵前后雌二醇分泌过多^[20]或生发泡过早破裂^[21]或卵泡过度刺激^[22],影响卵母细胞质量或生殖道环境,从而导致受精降低,甚至影响胚胎发育。同时,青年牛对外源 FSH 剂量变化反应更敏感,较高剂量 FSH 的使用可能会引起青年牛卵巢体积过度增大,卵泡发育数量过多,导致输卵管伞接受排卵卵子存在机械障碍,最终影响了可用胚胎数量。本研究核心群供体牛超排 FSH 适宜剂量为 260 ~ 280 mg,是否有更适宜 FSH 剂量需要进一步研究。

3.2 精液质量对超排效果的影响

公牛精液质量是影响供体超排效果的重要因素。孙伟等^[23]研究表明高受精能力种公牛人工输精受孕率范围在 $(60 \pm 5)\%$,正常受精能力种公牛人工输精受孕率范围在 $(40 \pm 5)\%$,二者之间相差20%。Souza等^[19]选用4头高受精能力公牛精液用于供体超排,胚胎受精率达到83.4%。王腾飞等^[24]选用不同活力公牛精液用于体外受精后也获得相类似结果,高活力精液体外受精后囊胚率显著增加。本研究中4头公牛精液用于核心群供体牛超排人工授精后未受精卵数没有显著增多情况,获得平均可用胚胎数也均在6.0枚以上,但是HO12286和HO18693使用后获得的平均可用胚胎数量更多,均在7.0枚以上。因此,结合牧场日常母牛群人工授精受孕率统计情况,选择受孕率较高的公牛精液用于核心群超排供体牛人工授精,能够进一步提高核心群奶牛超排效果。

3.3 免疫反应对胚胎移植的影响

国内规模牧场会定期对牛群进行集中疫苗接种,提高牛群免疫力,而有关于疫苗接种对受体胚胎移植妊娠率的影响还未见报道。疫苗接种后会引起牛群体内与T淋巴细胞抗原提呈相关的先天免疫反应,如炎症和急性期反应^[25-26],这些免疫反应与妊娠维持^[27]和牛繁殖性能^[28]呈负相关。进一步的讲,疫苗佐剂注射后能够刺激机体体内促炎细胞因子合成^[26],促炎细胞因子通过对胚胎的直接毒性作用并减少子宫内膜细胞增殖而影响妊娠维持^[27];同时,急性期反应引起的体温升高和子宫内膜PGF2 α 合成增加导致母牛早期妊娠中断^[27]。Ferreira等^[29]研究结果已经表明Nelore牛定时人工授精后30d接种疫苗会导致母牛妊娠损失增加4倍。本研究不同批次受体移植后也获得了与上述研究相似的结果,第4批次受体胚胎移植妊娠率显著低于其他3个批次受体胚胎移植妊娠率,原因可能就是由于第4批次受体母牛群在胚胎移植前进行了疫苗接种,引起受体体内免疫反应,促炎因子增加,体温升高,子宫内环境和激素分泌受到干扰,子宫内膜细胞增殖减少,导致移植后的胚胎早期死亡。因此,胚胎移植前受体母牛避免疫苗接种能够保证移植后胚胎正常附植与发育,提高受体胚胎移植妊娠率,同时也需要进一步研究受体牛的适宜疫苗接种时间,以保证受体牛获得足够的免疫能力。

4 结 论

综上所述,核心群奶牛超排适宜剂量为260~

280 mg FSH;选择高受精能力公牛精液和超排反应好的供体牛进行重复超排能够提高供体超排效率;移植前受体避免疫苗接种能够提高胚胎移植妊娠率。

参考文献:

- [1] 李姣,刘光磊,赵晓铎,等. 国家奶牛核心育种场建设现状及建议[J]. 中国奶牛,2020(3):24-26.
- [2] 朱化彬,王皓宇,杜卫华,等. 我国胚胎生物技术进展及其在良种牛扩繁中的应用[J]. 中国畜牧杂志,2014,50(2):61-67.
- [3] VIANA J. 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals[J]. Embryo Technology Newsletter, 2019, 37(4):7-25.
- [4] MIKKOLA M, HASLER J F, TAPONEN J. Factors affecting embryo production in superovulated Bos taurus cattle[J]. Theriogenology, 2019, 32(2):104-124.
- [5] NARANJO CHACN F, MONTIEL PALACIOS F, CANSECO SEDANO R, et al. Embryo production after superovulation of bovine donors with a reduced number of FSH applications and an increased eCG dose[J]. Theriogenology, 2020, 141(3):168-172.
- [6] KAFI M, MCGOWAN MR. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle[J]. Anim. Reprod. Sci., 1997, 48(24):137-157.
- [7] MAPLETOFT R J, KRISTINA B S, GREGG P A. Recent advances in the superovulation in cattle[J]. Reprod. Nutr. Dev., 2002, 42(6):601-611.
- [8] SILVA J C C, ALVAREZ R H, ZANENGA C A, et al. Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle[J]. Anim. Reprod., 2009, 6(3):440-445.
- [9] 武浩楠,郑鹏,黄贺,等. 影响奶牛超数排卵和胚胎移植的因素[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014(1):48-50.
- [10] 安志兴,刘俊平,王超,等. 青年荷斯坦奶牛初次超数排卵试验[J]. 中国兽医学报,2003,23(3):303-304.
- [11] 巴特尔,孙伟,苏和,等. 荷斯坦牛生产体内性控胚胎的试验研究[J]. 中国奶牛,2012,26(11):22-25.
- [12] SILVA J C, COSTA L L, SILVA J R. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers[J]. Anim. Reprod. Sci., 2002, 69(1/2):1-8.
- [13] 刘宜存. 奶牛超数排卵及胚胎移植的试验研究[J]. 中国奶牛,2011(10):35-40.
- [14] 毕江华,李树静,冯春涛,等. 荷斯坦奶牛高强度重复超数排卵的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2009(8):54-55.
- [15] KIMURA K. Superovulation with a single administration of FSH in aluminum hydroxide gel: A novel superovulation method for cattle[J]. J. Reprod. Dev., 2016, 62(5):423-429.
- [16] ROSER J F, ETCHARREN M V, MIRAGAYA M H, et al. Superovulation, embryo recovery, and pregnancy rates from seasonally anovulatory donor mares treated with recombinant equine FSH (reFSH)[J]. Theriogenology, 2020, 142:291-295.
- [17] REDHEAD A K, SIEW N, LAMBIE N, et al. The relationship

- between circulating concentration of AMH and LH content in the follicle stimulating hormone (FSH) preparations on follicular growth and ovulatory response to superovulation in water buffaloes [J]. Anim. Reprod. Sci., 2018, 188: 66-73.
- [18] 何俊丹. 郑县红牛同期发情与超数排卵研究[J]. 河南畜牧兽医(综合版), 2016, 37(10): 5-7.
- [19] SOUZA A H, SARTORI R, GUENTHER J N, et al. Effect of semen source and dose of FSH on superovulatory response and embryo production in Holstein heifers [J]. Anim. Reprod., 2007, 4(3): 70-76.
- [20] KANITZ W, BECKER F, SCHNEIDER F, et al. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination [J]. Reprod. Nutr. Dev., 2002, 42(6): 587-599.
- [21] REAVH I, BUTLER W R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes [J]. J. Reprod. Fertil., 1996, 106(1): 39-47.
- [22] ALFURAJI M M, ATKINSON T, BROADBENT P J, et al. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG monoclonal antibodies [J]. Anim. Reprod. Sci., 1993, 33(1/4): 99-109.
- [23] 孙伟. 奶牛种公牛培育及性别控制冷冻精液生产效率影响因素的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2021.
- [24] 王腾飞, 张燕, 王彦平, 等. 奶牛活体采卵—体外受精效率的影响因素研究[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(2): 574-580.
- [25] RODRIGUEZ L L, GRUBMAN M J. Foot and mouth disease virus vaccines [J]. Vaccine, 2009, 27(4): 90-94.
- [26] RODRIGUES M C, COOKE R F, Marques R S, et al. Effects of vaccination against respiratory pathogens on feed intake, metabolic, and inflammatory responses in beef heifers [J]. J. Anim. Sci., 2015, 93(9): 4443-4452.
- [27] HSNSSEN P J, SOTO P, NATZKE R P. Mastitis and fertility in cattle: Possible involvement of inflammation or immune activation in embryonic mortality [J]. Am. J. Reprod. Immunol., 2004, 51(4): 294-301.
- [28] COOKE R F, ARTHINGTON J D, ARAUJO D B, et al. Effects of acclimation to human interaction on performance, temperament, physiological responses, and pregnancy rates of Brahman-crossbred cows [J]. J. Anim. Sci., 2009, 87(12): 4125-4132.
- [29] FERREIRAL C L, COOKE R F, MARQUES R S, et al. Effects of vaccination against foot-and-mouth disease virus on reproductive performance of Bos indicus beef cows [J]. J. Anim. Sci., 2016, 94(1): 401-405.

Study on the Influence Factors of Superovulation in Nucleus Herd for Dairy Cattle

HAO Hai-sheng, ZHAO Shan-jiang, DU Wei-hua, ZHAO Xue-ming,

PANG Yun-wei, ZOU Hui-ying, SONG Jin-hui, ZHU Hua-bin*

(Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of different factors on superovulation in core herd for dairy cattle. [Method] 27 donors were superovulated with three doses of FSH and 4 bull semen, respectively. Fresh embryos were transferred in recipients. [Result] The results showed that the mean ($\pm$ SEM) number of transferable embryos (7.8 ± 0.95) in double superovulation was significantly higher than the number of transferable embryos (5.7 ± 0.91) in first superovulation ($P < 0.05$). The mean number of transferable embryos (6.0 ± 1.18 and 7.7 ± 0.90) in the 260 and 280 mg FSH groups were significantly higher than the number of transferable embryos (4.6 ± 1.29) in the 300 mg FSH group ($P < 0.05$). There was no significant difference on the mean number of transferable embryos among 4 bull semen ($P < 0.05$). Pregnancy rate of fresh embryo was affected significantly by vaccination in recipients ($P < 0.05$). [Conclusion] Core herd could be superovulated with lower total amount of FSH and using bull semen of high fertilization ability for dairy cattle. Repeat superovulation could increase the number of transferable embryos. Avoiding vaccination might increase the pregnancy rate of embryo transfer in recipients.

Key words: dairy cattle; superovulation; FSH; semen; embryo transfer