

河南大尾寒羊超数排卵研究

张静芳¹, 王新庄^{1,2,*}, 石奎林³, 和小娥², 刘芳², 赵俊金⁴, 孟飞⁴, 房元海⁴

(1. 西北农林科技大学, 陕西 杨凌 712100; 2. 河南农业大学, 河南 郑州 450002;

3. 平顶山市畜牧局, 河南 平顶山 467000; 4. 全国畜牧总站, 北京 100193)

摘要: 对30只河南大尾寒羊进行超数排卵处理, 研究不同激素、不同季节、不同输精方式以及重复超数排卵对其超数排卵效果的影响。结果表明: 采用加拿大产FSH处理, 河南大尾寒羊的只均黄体数(15.76)和只均获胚数(12.76)显著高于采用新西兰产FSH组(11.78、8.78); 冬季处理的河南大尾寒羊的只均黄体数(18.11)、只均获胚数(14.84)和只均可用胚数(5.21)显著高于春季(13.44、9.44、3.78)和秋季处理组(11.61、9.56、2.72); 采用350 mg/只剂量FSH处理, 河南大尾寒羊只均黄体数(18.27)和只均胚胎数(14.53)显著高于300 mg/只剂量组(12.23、10.23), 且优于400 mg/只剂量组; 腹腔内子宫角输精, 河南大尾寒羊只均可用胚数(4.68)显著高于阴道输精处理(1.89); 重复超数排卵各次之间的只均黄体数、只均胚胎数和只均可用胚数差异不显著。

关键词: 超数排卵; 胚胎; 黄体; 可用胚; 河南大尾寒羊

中图分类号: S826.9⁺2 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2010)08-0134-04

Study on the Superovulation of Henan Long-tail Han Sheep

ZHANG Jing-fang¹, WANG Xin-zhuang^{1,2,*}, SHI Kui-lin³, HE Xiao-e²,

LIU Fang², ZHAO Jun-jin⁴, MENG Fei⁴, FANG Yuan-hai⁴

(1. Northwest A & F University, Yangling 712100, China; 2. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

3. Pingdingshan Animal Husbandry Bureau, Pingdingshan 467000, China;

4. National Animal Husbandry and Veterinary Service, Beijing 100193, China)

Abstract: To study the effects of hormone, season, insemination method and repeated superovulation on superovulatory response in Henan Long-tail Han sheep, a total of 30 Henan Long-tail Han sheep were investigated. The results demonstrated that the average corpus luteum (CL) and average embryos of Canada's FSH were significantly more than that of Newzealand's FSH. The average CL, average embryos and average available embryos of winter were significantly more than that of spring and autumn. The average CL and average embryos of 350 mg dose of Canada's FSH were significantly more than that of 300 mg, and the average available embryos of intrauterine cervixes insemination were significantly more than that of aginal insemination. No significant difference among the first superovulation, the second superovulation and the third superovulation was observed.

Key words: Superovulation; Embryo; Corpus luteum; Available embryos; Henan Long-tail Han sheep

收稿日期: 2010-03-30

基金项目: 农业部畜禽牧草品种资源保护项目(农财[2008] 58号)

作者简介: 张静芳(1985-), 女, 河南安阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 兽医产科学和动物胚胎工程。

*通讯作者: 王新庄(1963-), 男, 陕西渭南人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事兽医产科学与胚胎工程研究。

由于保护措施不力以及对动物遗传资源重视不够等原因,最近 20 多 a 来,中国畜禽遗传资源数量逐渐下降,有的地方品种甚至处于濒危的境地,因此,如何保护地方品种遗传资源成为一个亟待解决的问题。河南大尾寒羊是河南省的优良地方品种,具有常年发情、多胎多产、繁殖率高、生长发育快、肉质性能好等优点。但由于引入品种的代替以及盲目的杂交改良,现在已面临濒危的局面,保种工作迫在眉睫。保护品种资源有多种方法,通过建立胚胎基因库来保护地方品种效果显著,而有效的超数排卵是获取胚胎的基础性工作。本试验对河南大尾寒羊进行超数排卵研究,旨在针对该品种建立一个合理有效的超数排卵方案,获得更多更优的胚胎,从而建立河南大尾寒羊胚胎基因库,增加河南大尾寒羊群体数量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 试验羊选自河南郟县,年龄在 2~4 周岁。供体母羊 30 只,均为健康无疾病,性周期正常的空怀母羊。

1.1.2 试验药品 CIDR(孕酮阴道栓)为新西兰产,每个 CIDR 含 0.3 g 孕酮;Follitron-V 为加拿大产 FSH(促卵泡激素),400 mg/支,批号 E021-B111;Ovagen 为新西兰产 FSH,17.6 mg/支,批号 220169;Follicle-stimulating Hormone 为美国产 FSH,批号 3097;冲卵液为新西兰产,批号 1380549;胎牛血清为杭州市四季青生物工程材料有限公司生产,批号 090502;胚胎保存液为新西兰产,批号 5227;PG(氯前列醇)为丹东市绿丹和华动物药有限公司生产,批号 20090302;LH RH-A3(促排卵素 3 号)为宁波市三生药液有限公司生产,批号 080206。

1.2 方法

1.2.1 超数排卵处理方法 分别在春季(4—5 月)、秋季(10—11 月)和冬季(1—2 月)对河南大尾寒羊用不同产地、不同剂量的 FSH,采用 CIDR+FSH+PG 法进行超数排卵处理,放入 CIDR 的当天记为第 1 天,第 10 天开始递减肌注 FSH,连续 4 d,共 8 次,每次间隔 12 h。在第 5 次和第 6 次注射 FSH 时同时注射 PG 0.1 mg/只,第 6 次注射 FSH 时撤栓。发情后采用自然交配、阴道输精和腹腔内子宫角输精 3 种方法配种,配后注射促排 3 号 25 μg/只。

1.2.2 冲胚与检胚 配种后第 6 天采用常规手术法从子宫角冲胚,冲胚结束后马上于显微镜下做质

量评定。

1.2.3 统计分析 采用 SPSS13.0 对各组数据进行方差分析和多重比较,结果以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 不同产地 FSH 的超数排卵效果

由表 1 可知,采用新西兰产的 FSH,河南大尾寒羊超数排卵获得的只均黄体数显著低于采用加拿大和美国产 FSH 组($P<0.05$),美国产 FSH 组与加拿大产 FSH 组之间差异不显著($P>0.05$);美国产 FSH 组所得只均获胚数与加拿大和新西兰产 FSH 组之间差异不显著,加拿大产 FSH 组显著高于新西兰产 FSH 组;采用加拿大、新西兰和美国产 FSH 各组在只均可用胚数上无显著差异。

表 1 不同产地 FSH 对大尾寒羊超数排卵效果的影响

FSH 产地	处理 只次	只均黄体 数/枚	只均获胚 数/枚	只均可用胚 数/枚
加拿大	33	15.76±4.53 ^a	12.76±5.18 ^a	3.88±2.80 ^a
新西兰	18	11.78±3.62 ^b	8.78±2.67 ^b	3.83±3.23 ^a
美国	4	15.75±1.50 ^a	11.25±6.29 ^{ab}	4.75±3.59 ^a

注:同列所标字母相同者表示差异不显著($P>0.05$),不相同者表示差异显著($P<0.05$)。下表同

2.2 不同季节的超数排卵效果

在春季(4—5 月)、秋季(10—11 月)和冬季(1—2 月)各进行一次超数排卵处理,结果(表 2)表明,冬季河南大尾寒羊超数排卵处理效果显著高于秋季和春季($P<0.05$),春季和秋季河南大尾寒羊超数排卵效果差异不显著。

表 2 不同季节对大尾寒羊超数排卵效果的影响

季节	处理 只次	只均黄体 数/枚	只均获胚 数/枚	只均可用胚 数/枚
春季	18	13.44±2.95 ^b	9.44±2.09 ^b	3.78±1.93 ^b
秋季	18	11.61±3.05 ^b	9.56±2.57 ^b	2.72±2.08 ^b
冬季	19	18.11±4.00 ^a	14.84±3.30 ^a	5.21±1.72 ^a

2.3 不同剂量 FSH 超数排卵效果

由于美国产 FSH 供试羊数量较少,没有做剂量上的对比。只对不同剂量的加拿大产 FSH 和新西兰产 FSH 对河南大尾寒羊超数排卵效果做了比较分析。由表 3 可知,加拿大产 FSH 350 mg/只剂量组的只均黄体数和只均获胚数显著高于 300 mg/只剂量组($P<0.05$),与 400 mg/只剂量组之间差异不显著($P>0.05$),但只均黄体数和只均获胚数明显比 400 mg/只剂量组多,只均可用胚数 3 个剂量组之间差异不显著。新西兰产 FSH 3 个剂量组之间的只均黄体数、只均获胚数和只均可用胚数差异不显著。

表 3 不同剂量 FSH 对大尾寒羊超数排卵效果的影响

FSH 产地	剂量/(mg/只)	处理只次	只均黄体数/枚	只均获胚数/枚	只均可用胚数/枚
加拿大	400	5	15.80±4.97 ^{ab}	10.20±4.92 ^{ab}	1.40±3.13 ^a
	350	15	18.27±9.46 ^b	14.53±11.00 ^b	4.27±6.88 ^a
	300	13	12.23±4.81 ^a	10.23±4.90 ^a	3.15±4.24 ^a
新西兰	17.6	10	13.20±7.33 ^a	9.90±6.62 ^a	4.60±8.15 ^a
	15.8	5	10.00±5.96 ^a	7.80±5.97 ^a	1.60±3.57 ^a
	15.5	3	11.50±6.36 ^a	9.50±3.53 ^a	5.00±3.53 ^a

2.4 不同输精方式的超数排卵效果

由表 4 可知,通过自然交配、阴道输精以及腹腔内子宫角输精 3 种受精方法所获得的只均黄体数和只均获胚数无显著差异($P>0.05$),经阴道输精的只均可用胚数显著低于自然交配和子宫角输精($P<0.05$)。

表 4 不同输精方式对大尾寒羊超数排卵效果的影响

输精方式	处理只次	只均黄体数/枚	只均获胚数/枚	只均可用胚数/枚
自然交配	18	13.39±4.46 ^a	9.44±3.18 ^a	3.78±1.52 ^a
阴道输精	9	14.22±4.94 ^a	11.78±5.65 ^a	1.89±4.14 ^b
腹腔内子宫角输精	28	15.18±5.62 ^a	12.43±6.59 ^a	4.68±2.61 ^a

2.5 重复超数排卵的效果

对大尾寒羊分别进行 3 次重复超数排卵处理,间隔时间分别为 130 d 和 90 d,结果(表 5)表明,第 2 次超数排卵和第 3 次超数排卵的只均黄体数、只均获胚数以及只均可用胚数与初次超数排卵之间并无显著差异($P>0.05$)。

表 5 重复超数排卵对大尾寒羊超数排卵效果的影响

重复超数排卵次数	处理只次	只均黄体数/枚	只均获胚数/枚	只均可用胚数/枚
第 1 次	25	13.80±2.87 ^a	10.16±3.34 ^a	4.04±2.86 ^a
第 2 次	19	14.74±4.21 ^a	13.00±5.53 ^a	4.16±2.14 ^a
第 3 次	11	15.00±5.00 ^a	11.73±2.53 ^a	3.82±2.04 ^a

3 讨论

3.1 激素对大尾寒羊超数排卵的影响

影响动物超数排卵的因素有许多,有动物本身、促性腺激素、用药时间和重复超数排卵^[1]以及季节^[2-4]等。激素是影响超数排卵的一个重要因素,激素的不同种类、剂量、批号对超数排卵都有影响。在相同的饲养条件下,3 个产地 FSH 处理组的只均黄体数和只均获胚数有显著差异,美国产 FSH 和加拿大产 FSH 超数排卵效果优于新西兰产 FSH。可能

是美国产 FSH 和加拿大产 FSH 的 FSH/LH 的比例与河南大尾寒羊品种本身的生理基础比较协调,使得其能够适应这种激素的刺激,从而效果较好。但不同产地 FSH 所获得的只均可用胚数无显著差异,主要是有未受精的卵子以及胚胎在发育过程中发生退化,这可能与供体羊体内环境有关。加拿大产 FSH 350 mg/只剂量对河南大尾寒羊的超数排卵效果最佳,300 mg/只剂量组供体羊排卵降低,黄体数量少,质量差,400 mg/只组部分供体羊卵巢出现水肿,说明 FSH 使用过量。由于对地方品种绵羊的超数排卵研究较少,加上地方品种个体之间对 FSH 的敏感性差异较大,而且未有对河南大尾寒羊超数排卵的先例,因此,对其的超数排卵研究尚处于探索试验阶段。

3.2 季节对大尾寒羊超数排卵的影响

季节也是影响超数排卵的一个重要因素。本研究结果显示,季节对河南大尾寒羊排卵影响显著。冬季超数排卵的效果显著高于秋季和春季,这与张立等^[5]的研究结果一致。试验所用河南大尾寒羊均购自河南平顶山郏县当地农户,在春季对河南大尾寒羊放牧较少,主要进行舍饲,导致缺乏必要的营养,春乏严重,羊只整体营养状况不佳,短时间内加强饲养管理没有明显的提高,超数排卵效果较差。秋季经过一段时间的补饲,加上青草充足,营养状况比春季好,但初秋时节,气温相对较高,河南大尾寒羊全身被毛浓密,皮厚脂多,爱扎堆,怕热,超数排卵效果也差。冬季温度下降,羊群整体膘情较好,超数排卵效果显著好于春季和秋季。

3.3 不同输精方式对大尾寒羊超数排卵的影响

不同输精方式影响卵子的受精率,而受精率又直接影响胚胎的可利用率。河南大尾寒羊采用子宫角输精可用胚胎数较高,这与姚玉昌等^[6]的研究一致。河南大尾寒羊脂尾肥大,采用自然交配需要人工辅助,不易操作,而且浪费时间。采用阴道输精法简便快捷,但受精效果不佳。研究证明,输精深度是

影响受精效果的重要因素, 阴道输精时深度不够, 而且绵羊子宫颈结构特殊, 构造复杂, 有突起和皱褶, 形成拦截精子的栏栅, 使得通过子宫颈与卵子结合的精子较少, 受精率低^[7, 8]。采用腹腔内子宫角输精能够使精液跳过子宫颈的阻碍, 缩短精子运行距离, 直接到达子宫角与卵子及时结合, 提高受精率。

3.4 重复超数排卵对大尾寒羊超数排卵的影响

本研究结果显示, 第2次超数排卵和第3次超数排卵与初次超数排卵之间无显著差异, 说明大尾寒羊的超数排卵效果比较稳定, 这与 Forcada 等^[9]在阿拉贡绵羊上的研究一致。魏成斌等^[10]在奶牛上连续重复6次超数排卵, 各次之间可用胚数差异不显著。张果平等^[11]认为, 重复超数排卵对可用胚胎率影响较大。李雪松等^[12]认为, 随着排卵次数的增加, 采胚数和可用胚数都下降, 可能是手术采胚过程中造成的输卵管和子宫粘连所致。在大尾寒羊的超数排卵处理和采胚过程中, 对手术以及手术后护理的要求非常严格, 未造成子宫输卵管粘连。另外, 重复超数排卵的间隔时间较长, 分别是4个月和3个月, 使得供体羊得到充分恢复, 避免了短时间内受到连续频繁的刺激而影响超数排卵效果。

有待保种的优良地方品种还有很多, 通过对河南大尾寒羊超数排卵影响因素的分析, 可以为建立合理、有效的超数排卵方案提供依据。

参考文献:

[1] 赵兴绪. 兽医产科学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 192
[2] Mitchell L M, Dingwall W S, Mylne M J A, *et al.* Sea-

son affects characteristics of the pre-ovulatory LH surge and embryo viability in superovulated ewes[J]. *Animal Reproduction Science*, 2002, 73(3/4): 163-174.
[3] Bettencourt E M, Bettencourt C M, Chagas S J, *et al.* Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos[J]. *Small Ruminant Research*, 2008, 74(1/3): 134-139.
[4] Lehloeny K C, Greyling J, Grobler S. Effect of season on the superovulatory response in Boer goat does[J]. *Small Ruminant Research*, 2008, 78(1/3): 74-79.
[5] 张立, 黄春华, 栗军, 等. 不同区域绵羊最佳超数排卵季节的研究[J]. *中国草食动物*, 2006, 26(21): 170-171.
[6] 姚玉昌, 李武, 亓美玉. 不同输精方式对绵羊超数排卵效果研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2006(1): 43-44.
[7] 庞训胜, 王锋, 尤向峰, 等. 山羊和绵羊子宫颈管解剖结构的比较[J]. *畜牧与兽医*, 2006, 38(6): 46-48.
[8] 刘玉峰. 子宫内输精技术在绵羊生产中的应用研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2007(5): 77-79.
[9] Forcada F, Abecia J A, Lozano J M, *et al.* Repeated superovulation of high-prolificacy Rasa Aragonesa ewes before culling as an inexpensive way to obtain high-quality embryos[J]. *Livestock Production Science*, 2000, 66(3): 263-269.
[10] 魏成斌, 贺文杰, 辛晓玲, 等. 奶牛重复超数排卵试验观察[J]. *河南农业科学*, 2007(1): 102-103.
[11] 张果平, 王金文, 王德芹, 等. 影响杜泊绵羊超数排卵效果的因素分析[J]. *江苏农业学报*, 2008, 24(3): 293-297.
[12] 李雪松, 吕津, 桑润滋, 等. 重复超数排卵对奶山羊超数排卵效果的影响[J]. *动物医学进展*, 2005, 13(2): 8-9.