

台灣荷蘭乳牛胚生產之最適條件⁽¹⁾

李善男⁽²⁾⁽⁴⁾ 沈朋志⁽²⁾ 杜茂聖⁽³⁾ 許義明⁽²⁾ 蕭振文⁽²⁾

收件日期：91 年 8 月 22 日；接受日期：91 年 11 月 22 日

摘 要

本研究之目的為探討荷蘭乳牛在台灣之氣候環境下，應用激濾泡素（follicle stimulating hormone, FSH）進行超級排卵後胚的生產效率以供胚移置應用之參考。乳牛超級排卵 260 頭，具備完整資料者 220 頭供分析用。超級排卵以 FSH-P 40 mg 分成 7 次，每日 2 次以遞減方法肌肉注射。試驗設計以年份別（1998、1999 及 2000 年）、年齡別（<3, 3-6 及 >6 歲）、胖瘦度（ ≤ 2.5 , 2.75-3.0, 3.25-3.5, 3.75-4.0 及 ≥ 4.25 分）、產後至洗胚日數（<90, 91-120, 121-150, 151-300 及 >300 日）及地區別（東部、中北部及南部）區分之。統計分析以一般線性模式（GLM）法，分析年份、年齡、胖瘦度、產後至洗胚日數以及地區別對於超級排卵後乳牛之黃體生成數、胚沖洗數、一級胚數及可移置胚數（一級胚及二級胚之和）的影響。試驗結果顯示：2000 年平均黃體數及胚沖洗數較多，與其他年份比較，差異極顯著（ $P < 0.01$ ），但是對於平均一級胚數及可移置胚數並無顯著差異。一級胚之生產受到牛隻年齡（>6 歲， $P < 0.05$ ）及胖瘦度（3.25-3.5 分， $P < 0.01$ ）之影響；同時一級胚數及可移置胚數均受到產後至洗胚日數之影響（121-150 天， $P < 0.05$ ）。而在台灣東部、中北部及南部超級排卵反應之結果，差異不顯著（ $P > 0.05$ ），但中北部之乳牛平均一級胚數及可移置胚數有較高之趨勢。結論認為：以超級排卵進行胚之生產，宜選擇大於 6 歲齡母牛，胖瘦度為 3.25-3.5 分，分娩後 121-150 日內洗胚能獲得最佳之成績。

關鍵詞：乳牛、超級排卵、胚生產。

緒 言

乳牛的超級排卵成效是胚移置技術領域中極重要的一環。影響超級排卵的因素甚多，例如供胚牛卵巢對於激濾泡素（FSH）（李等，1993）的反應，因此，排卵率即為影響胚生產的主要變數。其他的因素尚包括 FSH 注射時間，劑量以及方法，超級排卵時大型濾泡（dominant follicle）（沈及李，1999）之有無等。Kafi and McGowan（1997）將影響超級排卵反應之因素，分為本身及外在兩方面：前者如年齡、品種、大型濾泡等，後者如季節、環境、營養、非臨床疾病、泌乳、重複超級排卵及內分泌素製備等。台灣位於亞熱帶，乳牛的繁殖生理與飼養管理亦與胚之生產有密切關係。本

(1) 行政院農業委員會畜產試驗所研究報告第 1148 號。

(2) 行政院農業委員會畜產試驗所生理組。

(3) 行政院農業委員會畜產試驗所花蓮種畜繁殖場。

(4) 通訊作者。

研究之目的即為探討台灣荷蘭乳牛在此氣候環境下，應用 FSH 進行超級排卵後，分析胚之生產效率，以供胚移置應用之參考。

材料與方法

I. 試驗材料：

全省參與胚移置計畫之乳牛群，經超級排卵之牛隻共 260 頭，具備完整資料者 220 頭供分析用。試驗期間自 1998 至 2000 年，合計 3 年。

II. 試驗方法：

(i). 資料取得與分析：

1. 乳牛超級排卵之方法，為用 FSH-P 40 mg (アトリル.40, 日本ケンカ製藥株式會社) 分為 7 次，每日 2 次，於發情後第九日開始，以遞減劑量 (7.5、7.5、6.25、6.25、5.0、5.0 及 2.5 mg) 間隔 12 小時肌肉注射。
2. 將供胚牛之年齡分為三組：<3，3-6 及 >6 歲齡。
3. 乳牛之胖瘦度 (body condition score, BCS)，依據 Ferguson *et al.* (1994) 所述，BCS 由極瘦 (1 分) 至極胖 (5 分) 分為 5 大等級，以 3 分為中等胖瘦度。本研究依實際狀況，以 0.25 分間隔評鑑，細分為 5 小組： ≤ 2.5 、2.75-3.0、3.25-3.5、3.75-4.0 及 ≥ 4.25 分。評鑑時間為採胚日。
4. 產後至洗胚日數分為 5 組：<90、91-120、121-150、151-300 及 >300 日。
5. 試驗地區分為 3 組：東部(花蓮縣瑞穗)、中北部(彰化縣福興、桃園縣楊梅、中壢)及南部(台南縣柳營、善化、高雄縣大社、屏東縣萬丹)。
6. 試驗期間累計分為三年：1998、1999 及 2000 年。

(ii) 統計分析方法：

資料之統計分析以一般線性模式法 (general linear model) 最小平方 (least square) 分析年份、年齡、胖瘦度、產後至洗胚日數以及地區別對於平均黃體生成數 (直腸觸診法)、沖胚數、一級胚與可移置胚數 (一級胚及二級胚之和) (Lindner and Wright, 1983) 之影響。

III. 統計分析模式：

黃體數、沖胚數、一級胚數、可移置胚數 = 年份 + 年齡 + 胖瘦度 + 產後至洗胚日數 + 地區別 + 機差

結果與討論

年份別對於乳牛超級排卵之差異，由表 1 顯示平均黃體數 (corpus luteum/donor) 及沖胚數 (ova/donor) 於 2000 年均最高，差異極顯著 ($P < 0.01$)，但對於平均一級胚 (first grade embryo) 及可移置胚 (transferable embryo) 數差異均不顯著。沖胚數逐年提高之原因，可歸因於訓練人員之技術改進與熟練度提高之故。而 Hasler *et al.* (1983) 分析連續 6 年之超級排卵資料，發現年份間並無顯著差異。渠等認為，其原因由於供胚牛來源，洗胚人員不同，使用精液差別以及其他可能之因素互相抵銷所致。

表 1. 年份別對於乳牛超級排卵之差異

Table 1. Yearly difference in superovulatory responses of cows

Year	No.	Corpus luteum / donor	Ova / donor	First grade embryo / donor	Transferable embryo / donor
L S Means (\pm SE)					
1998	15	4.65 ^b (0.97)	2.68 ^b (1.79)	1.44 (0.75)	1.73 (0.87)
1999	81	6.55 ^a (0.48)	2.93 ^b (0.89)	1.83 (0.37)	2.47 (0.43)
2000	124	7.36 ^a (0.38)	5.65 ^a (0.71)	2.01 (0.29)	2.48 (0.34)

^{a, b} Means with the different superscript in the same item within the same column are significantly different ($P < 0.01$).

黃體數之多寡不受年齡之影響（表 2），但當年齡大於 6 歲時，平均沖胚數最多，差異顯著（ $P < 0.05$ ），同時一級胚及可移置胚數也最多。Donaldson (1984)認為沖胚數並無年齡效應，不過九歲以上時對於可移置胚數百分率會降低。超級排卵反應之下降，可能由於老牛對激性腺素處理之反應差，因而減少濾泡之生成（Lerner *et al.*, 1986；Erickson, 1966）所致。本試驗>6 歲組之牛隻，極少超過 9 歲，此或與上述國外研究結果不一致之原因。

表 2. 年齡別對於乳牛超級排卵之影響

Table 2. Effect of age on superovulatory responses of cows

Age group (years)	No.	Corpus luteum / donor	Ova / donor	First grade embryo / donor	Transferable embryo / donor
L S Means (\pm SE)					
<3	12	6.41 (0.66)	2.25 ^c (1.22)	1.63 ^b (0.51)	1.89 (0.59)
3~6	78	6.03 (0.54)	3.16 ^b (1.01)	1.43 ^c (0.42)	1.89 (0.49)
>6	130	6.13 (0.59)	5.86 ^a (1.09)	2.22 ^a (0.45)	2.91 (0.53)

^{a, b, c} Means with the different superscript in the same item within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

乳牛在分娩三個月之胖瘦度（body condition scores, BCS），會影響生育之指數（Markusfeld *et al.*, 1997）。分娩時過瘦，子宮疾病較多；過胖時易生酮症，且不易於第一次授精時懷孕。上述胖瘦度影響生育之研究，均與負熱能平衡（negative energy balance）產後之營養需求有關。Butler and Smith（1989）研究負熱能平衡與產後生殖功能之相互關係時，指出乳牛之負熱能平衡及體脂肪消耗率，與產後至第一次排卵日數及低受胎率有直接之關係。Senatore *et al.* (1996) 亦報告初產乳牛產後至 100 日內負熱能平衡對卵巢功能及生育力之影響，發現熱能平衡及體重均是決定產後至第一次排卵期間長短以及隨後生育力之重要關鍵因素。

本試驗（表 3）顯示，當洗胚時乳牛之胖瘦度在 3.25-3.5 分時，黃體數最多，而且沖胚數亦最多。與其他各組比較，差異均顯著（ $P < 0.05$ ）。而且受精後之平均一級胚數及可移置胚數亦最高。Moreira *et al.* (2000) 之研究指出，以 $BCS \geq 2.5$ 及 $BCS < 2.5$ 之泌乳牛，利用定時配種法比較二組之受胎率，發現 $BCS \geq 2.5$ 組（33.8%）比 $BCS < 2.5$ 組（18.1%）高（ $P < 0.02$ ）。此結果亦支持乳牛之胖瘦度確實影響排卵、受精以及胚發育之論點。

表 3. 胖瘦度評分對於乳牛超級排卵之影響

Tabel 3. Effect of body condition score (BCS) on the superovulatory responses of cows

BCS	No.	Corpus luteum / donor	Ova / donor	First grade embryo / donor	Transferable embryo / donor
L S Means (\pm SE)					
≤ 2.5	12	4.47 ^b (1.05)	3.35 ^{acd} (1.93)	1.80 (0.81)	2.18 (0.94)
2.75-3.0	40	6.39 ^{ab} (0.65)	3.62 ^b (1.21)	1.57 (0.50)	2.04 (0.59)
3.25-3.5	112	7.26 ^a (0.45)	6.55 ^a (0.84)	2.26 (0.35)	2.85 (0.41)
3.75-4.0	26	6.55 ^{ab} (0.72)	3.44 ^{bc} (1.33)	1.67 (0.55)	2.06 (0.65)
≥ 4.25	30	6.27 ^{ab} (0.71)	1.80 ^{bd} (1.32)	1.49 (0.55)	2.01 (0.64)

a, b, c, d Means with the different superscript in the same item within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

乳牛產後至沖胚之日數長短對於超級排卵之平均黃體數無顯著影響（表 4），但小於 90 日時之平均沖胚數較多，差異顯著（ $P < 0.05$ ）。對於平均一級胚及可移置胚數則以 121-150 日為最高，差異顯著（ $P < 0.05$ ）。此顯示生產一級胚之最高峰在泌乳中期。產後至沖胚之日數過長（ >300 日）之乳牛，仍被酪農作為供胚牛之原因，常因生育力低或繁殖障礙，期望經由超級排卵技術改善其生育力，可能因此導致一級胚及可移置胚數顯著減少（ $P < 0.05$ ）。

表 4. 產後至沖胚日數對於乳牛超級排卵之影響

Table 4. Effect of days since calving on superovulatory responses of cows

Days since calving	No.	Corpus luteum / donor	Ova / donor	First grade embryo / donor	Transferable embryo / donor
L S Means (\pm SE)					
<90	83	5.80 (0.59)	6.37 ^a (1.08)	1.49 ^{ac} (0.45)	2.06 ^{ac} (0.53)
91-120	18	5.68 (0.86)	3.92 ^{ab} (1.60)	1.80 ^{ab} (0.67)	2.16 ^{ac} (0.78)
121-150	24	6.21 (0.83)	3.66 ^{ab} (1.54)	2.85 ^a (0.64)	3.55 ^a (0.75)
151-300	64	6.53 (0.57)	2.80 ^b (1.06)	2.13 ^a (0.44)	2.47 ^a (0.52)
>300	31	6.72 (0.68)	2.02 ^b (1.26)	0.54 ^{bc} (0.52)	0.89 ^{bc} (0.61)

a, b, c Means with the different superscript in the same item within the same column are significantly different ($P < 0.05$).

在東部、中北部及南部之乳牛對於超級排卵之反應差異不顯著（ $P > 0.05$ ）。表 5 指出中北部乳牛之平均一級胚（2.34 個）及可移置胚數（2.79 個）有較高之趨勢。此或與中北部酪農選取之供胚牛性能條件較其他地區嚴謹有所差異造成。但由於東部、中北部及南部地區參與測試乳牛之數目有所差異，且年齡、管理與營養亦有不同，故可能影響測試結果。根據 Callesen *et al.* (1995) 分析生產 1,429 個可移置胚之影響因素，在眾多之因子中：供胚牛、胎次、內泌素、胚性別、精液別、技術員、年份別、季節別等，只有技術員（ $P < 0.01$ ）及供胚牛（ $P < 0.01$ ）兩者具有顯著影響到胚發育之變異及相關性。而供胚牛之因素可能蘊含排卵前期之內泌素分泌量影響受精及胚之早期發育（Callesen *et al.*, 1986）。

表 5. 地區別對於乳牛超級排卵之影響

Table 5. Effect of location difference on superovulatory responses of cows

Location	No.	Corpus luteum / donor	Ova / donor	First grade embryo / donor	Transferable embryo / donor
L S Means(\pm SE)					
East	46	6.48 (0.59)	3.18 (1.09)	1.51 (0.45)	2.04 (0.53)
Mid-north	53	5.92 (0.64)	3.75 (1.18)	2.34 (0.49)	2.79 (0.58)
South	121	6.17 (0.44)	4.32 (0.82)	1.44 (0.34)	1.86 (0.40)

結 論

本試驗結果指出，乳牛超級排卵之成效以及洗出胚之品質，均與供胚牛之選擇有關。例如年齡、胖瘦度評分、產後至沖胚之日數等，這些因素均會影響可移置胚數量。因此，欲提高超級排卵之效果，必須注意乳牛之基本生理條件與個別差異。

誌 謝

本試驗統計承黃鈺嘉博士之協助，謹申謝忱。

參考文獻

- 沈朋志、李善男。1999。大型優勢濾泡之有無對源自同一卵巢內小型腔狀濾泡之台灣黃牛卵母細胞體外發育能力之影響。中畜會誌 28(4):461~470。
- 李善男、蕭振文、徐烱松、楊振榮、許登造。1993。乳牛胚之移置研究（II）新鮮胚及冷凍胚之田間應用。畜產研究 26(4): 327~333。
- Butler, W. R. and R. D. Smith. 1989. Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. J. Dairy Sci. 72:767~783.
- Callesen, H., T. Greve and P. Hyttel. 1986. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. Theriogenology 25:71~86.
- Callesen, H., P. Lovendahl, A. Bak and T. Greve. 1995. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. J. Anim. Sci. 73:1539~1543.
- Donaldson, L. E. 1984. The effect of the age of the donor cow on embryo production. Theriogenology 21:963~967.
- Erickson, B. H. 1966. Development and sequence of the postnatal bovine ovary. J. Anim. Sci. 25:800~805.
- Ferguson, J. D., D. T. Galligan and N. Thomsen. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. J. Dairy Sci. 77:2695~2703.
- Hasler, J. F., A. D. McCauley, E. C. Schermerhorn and R. H. Foote. 1983. Superovulatory responses of Holstein cows. Theriogenology 19:83~99.
- Kafi, M. and M. R. McGowan. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. Anim. Reprod. Sci. 48:137~157.
- Lerner, S. P., W. V. Thayne, R. D. Baker, T. Henschen, S. Meredith, E. K. Inskeep, R. A. Daily, P. A. Lewis

- and R. L. butcher. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.* 63: 176~183.
- Lindner, G. M. and R. W. Wright. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407~416.
- Markusfeld, O., N. Galon and E. Ezra. 1997. Body condition score, health, yield and fertility in dairy cows. *Vet. Rec.* 141: 67~72.
- Moreira, F., C. Risci, M. F. A. Pires, J. D. Ambrose, M. Drost, M. DeLorenzo and W. W. Thatcher. 2000. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology* 53:1305~1319.
- Senatore, E. M., W. R. Butler and P. A. Oltenacu. 1996. Relationships between energy balance and post-partum ovarian activity and fertility in first lactation dairy cows. *J. Anim. Sci.* 62: 17~23.

The optimal conditions for producing embryos from Holstein-Friesian cows in Taiwan ⁽¹⁾

Shan-Nan Lee^{(2) (4)}, Perng-Chi Shen⁽²⁾, Mao-Sheng Duh⁽³⁾,
I-Ming Hsu⁽²⁾ and Jem-Wem Shiau⁽²⁾

Received: Aug. 22, 2002; Accepted: Nov. 22, 2002

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effects of different factors on embryo production following superovulation in the subtropical environmental conditions in Taiwan. Of 260 cows superovulated in three consecutive years from 1998 to 2000, there were 220 observations used in this analysis. Superovulation treatment for all cows consisted of twice daily intramuscular (IM) injection of descending doses of porcine follicle stimulating hormone for 3.5 days, for a total dose of 40 mg. For statistical analysis, a general linear model was generated for each independent variable including the year (1998, 1999, 2000), age of donor (< 3, 3-6, > 6), body condition scores (BCS) (≤ 2.5 , 2.75-3.0, 3.25-3.5, 3.75 - 4.0, ≥ 4.25), days since calving (≤ 90 , 91-120, 121-150, 151-300, > 300), and the geographical location (eastern, mid-northern and southern Taiwan) on flushing. The dependent variables included the number of corpus luteum (CL), the ova recovered per donor, the first grade embryos and the total transferable embryos. Results show that more CL was palpated and more ova were recovered in the year of 2000 ($P < 0.01$). However, there was no significant difference in transferable embryos production among years. The first grade embryos were significantly affected by age (> 6 years, $P < 0.05$) and BCS (3.25-3.5, $P < 0.01$). The number of first grade and transferable embryos recovered from cows were affected by the days since calving (121-150, $P < 0.05$). There was no significant difference in the geographic location on the superovulatory responses ($P > 0.05$). However, a tendency in the production of first grade embryos and transferable embryos in the mid-north district was existed. We concluded that the embryo production would appear to be associated with age of donor (> 6 years), body condition scores (3.25-3.5) and days since calving (121-150 days) when start of superovulation.

Key words : Dairy cows, Superovulation, Embryo production

-
- (1) Contribution No. 1148 from Livestock Research Institute, Council of Agriculture, Executive Yuan.
(2) Physiology Division, COA-LRI, Hsinhua 712, Taiwan, R.O.C.
(3) Hualien Animal Propagation Station, COA-LRI, Hualien 973, Taiwan, R.O.C.
(4) Corresponding author.