

石俊松, 周荣, 曾海玉, 等. 体细胞克隆猪繁殖性能及后代生长性能评估[J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(S): 100-103.
SHI Junsong, ZHOU Rong, ZENG Haiyu, et al. Evaluation of reproductive performance and offspring growth performance of somatic cloned pigs[J]. Journal of South China Agricultural University, 2019, 40(S): 100-103

体细胞克隆猪繁殖性能及后代生长性能评估

石俊松¹, 周 荣¹, 曾海玉¹, 麦然标¹, 罗绿花¹, 顾 婷², 吴珍芳^{1,2}, 蔡更元^{1,2}

(1 广东温氏种猪科技有限公司, 广东 新兴 527400;
2 国家生猪种业工程技术研究中心/华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:本文旨在探讨克隆猪与供体猪在繁殖和遗传性能的关系, 评估体细胞克隆公猪在保存优良基因和商品猪生产中的应用。克隆皮杜公猪, 检测其精液质量相关指标, 比较克隆公猪、供体公猪与配母猪的窝产总仔、活仔数等指标, 并对两者后代进行生长性能测定。结果表明, 与供体猪相比, 克隆猪及后代在各项检测指标中均无显著差异, 说明克隆猪具有正常的繁殖性能, 且保留了供体优秀的遗传性能, 可以作为优秀种公猪进行生产应用。

关键词:公猪; 体细胞克隆; 繁殖性能; 后代; 生长性能

Evaluation of reproductive performance and offspring growth performance of somatic cloned pigs

SHI Junsong¹, ZHOU Rong¹, ZENG Haiyu¹, MAI Ranbiao¹, LUO Lyuhua¹,
GU Ting², WU Zhenfang^{1,2}, CAI Gengyuan^{1,2}

(1 Guangdong Wens Pig Breeding Co., Ltd., Xinxing 527400, China; 2 National Engineering Research Center for Swine Breeding Industry/College of Animal Science, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: This study was aimed to investigate the relationship between reproductive and genetic properties of cloned pigs and those of donor pigs, and to evaluate the application of somatic cell clone boars in the preservation of excellent genes and production of commercial pigs. Pietrain-Duroc hybrid boars were cloned, and their parameters of semen quality were determined. Reproductive total piglets and live piglets of sows mated with cloned boars and donor boars were compared. Growth performance of offspring of sows mated with cloned boars and donor boars were obtained. The results showed that there was no significant difference between the cloned pigs and the donor boars in various tested indexes as well as their offspring, which indicated that the cloned pigs had normal reproductive properties and retained the excellent genetic properties of the donors and could be applied as excellent boars in production.

Key words: boar; somatic cell clone; reproduction performance; offspring; growth performance

体细胞克隆技术在生产高性能动物^[1]、保护濒危动物^[2]以及医疗模型和应用^[3-4]方面具有巨大的潜在应用前景。在畜牧生产中, 猪克隆技术可作为一种无性繁殖技术用于复制生产性能优秀的种猪,

获得大批量基因型与供体种猪相同的克隆猪用于繁殖和育种, 从而加快群体的扩繁和遗传改良进程^[5]。然而, 克隆整体效率较低, 克隆动物存活数量较少, 对成年体细胞克隆动物进行系统的研究, 评估体细

胞克隆动物在各项生产应用中的效用至关重要,包括克隆动物及其后代作为食品的安全性。Yang等^[6]研究表明,和自然受精和人工授精产生的动物相比,克隆动物的奶和肉的成分没有明显差异。Tian等^[7]检测了100多项指标,克隆牛在肉和奶的成分上和同期饲养的非克隆牛没有任何差异。因此在耗时6年的研究后,美国食品药品监督管理局认为克隆动物,比如克隆牛、猪和山羊的肉和奶,可以安全食用^[8]。对于克隆动物的生产性能评估,尤其是克隆种猪能否正常生长和繁殖已有一些研究^[9-11],但是很少有克隆猪后代是否具有供体品种特性的报道,特别是是否具备供体的优良性状。

为了证明体细胞克隆猪在保存优良基因和商品猪生产中的应用,本文克隆皮杜公猪后统计其精液质量,记录其配种后与配母猪的产仔情况,并对其后代进行生长性能测定,系统地评估克隆猪的繁殖和遗传性能,以期为克隆猪的生产应用提供参考。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供体猪为种猪场1头体格和性能都表现优秀的皮杜公猪,克隆胚胎移植受体母猪为纯种大白母猪,与配母猪为长大白二元杂母猪,均来自温氏集团种猪场。

研究用主要设备有倒置显微镜(尼康)、显微操作仪(成茂)、体视镜(奥林巴斯)、A超(PIGLOG 105)、B超(亚卫)、生长性能测定设备(奥斯本)、正置显微镜(尼康)、冰箱(三菱)。

1.2 方法

1.2.1 克隆猪的生产 采用组织块培养法获得供体猪耳部成纤维细胞。卵母细胞来自屠宰场的母猪卵巢,培养成熟后使用显微操作仪去核,透明带下注入供体体细胞,电激重构胚获得克隆胚胎,培养至第2天,手术法^[12]将克隆胚胎移植到受体母猪输卵管内。移植胚胎后的受体母猪按常规方法正常饲养直至分娩。

1.2.2 种猪精液质量检测 种猪饲养至8月龄利用假畜台进行调教,调教成功后手工采精。采集的

精液样品立即运输至实验室,用标准方法进行质量检测 and 评价。相差显微镜进行精液观察;血细胞仪测定精子浓度、活力和异常精子的百分率;精密分析天平称量精液体积。

1.2.3 种猪配种繁殖性能测定 采集克隆公猪和供体的精液,稀释后随机选择发情的长大白二杂母猪进行人工授精,每头母猪输精2次。114 d后统计其与配母猪的产仔情况,统计窝均总仔、活仔、死胎、木乃伊等数据。

1.2.4 种猪F1代生长发育指标测定 克隆和供体猪配种后代断奶后集中调到测定站进行生长性状测定,使用奥斯本全自动种猪生产性能测定系统,主要采集体重为30~100 kg后代的采食量、体重等数据,结束测定当天根据种猪生产性能测定规程使用A超测定背膘厚,并根据背膘厚、体重等估计其瘦肉率。

1.3 数据处理

使用SPSS 18.0软件对相关数据进行统计分析,精液和产仔相关指标进行单因素方差分析和显著性分析;总采食量、日均采食量、日均增重、料肉比以入测体重作为协变量进行协方差分析,背膘厚、估计瘦肉率以结测体重作为协变量进行协方差分析。数据结果均表示为平均值±标准误。

2 结果与分析

2.1 克隆皮杜猪的生产

以特级皮杜公猪耳组织成纤维细胞为供体细胞,生产了550枚克隆胚胎,手术移植到2头发情母猪的输卵管内,28 d后B超检查到2头母猪均受孕,114 d后分娩1窝,共产5头克隆猪,4头健仔、1头弱仔,克隆效率为1.79%(分娩总仔/分娩移植胚胎),最终存活2头克隆猪,编号为PD03和PD05。

2.2 克隆种公猪精液质量测定

克隆公猪生长到8个月月开始调教,均顺利调教成功,对其精液检测结果见表1。由表1可知,和同期公猪站的非克隆猪相比,克隆猪的精液量、精子活力、畸形率均无显著变化,而克隆猪的精子密度显著高于非克隆猪的($P < 0.05$),结果表明克隆猪具有良好的产精能力,且精液质量优秀。

表1 公猪精液检测结果¹⁾

组别	检测份数	精液量/mL	精子活力	精子密度/($\times 10^8$ mL ⁻¹)	畸形率/%
PD03	13	203.08 ± 9.79	0.74 ± 0.01	3.80 ± 0.31a	6.33 ± 0.46
PD05	17	201.47 ± 6.10	0.72 ± 0.01	3.74 ± 0.29ab	7.22 ± 0.83
克隆猪	30	202.17 ± 5.36	0.73 ± 0.01	3.76 ± 0.21a	6.83 ± 0.51
非克隆猪	16	193.44 ± 8.88	0.73 ± 0.01	2.94 ± 0.24b	8.40 ± 0.69

1) 同列数据后凡是有一个相同字母者表示差异不显著($P > 0.05$,单因素方差分析)

2.3 克隆种公猪繁殖性能测定

克隆猪、供体与发情母猪配种后,统计与配母猪的窝均总产仔、活仔、弱仔数等指标,具体结果见表

2,数据分析表明两者在窝均总仔、活仔、弱仔、畸形、死胎和木乃伊方面均没有显著差异,结果说明克隆猪和供体一样,具备良好的繁育性能。

表 2 克隆和供体公猪配种后母猪分娩情况

组别	分娩窝数	窝均总仔/头	窝均活仔/头	窝均弱仔/头	窝均畸形/头	窝均死胎/头	窝均木乃伊/头
PD03 后代	15	11.70 ± 0.85	10.53 ± 0.80	0.33 ± 0.13	0.20 ± 0.11	0.53 ± 0.17	0.13 ± 0.09
PD05 后代	13	9.77 ± 1.01	9.00 ± 0.97	0.15 ± 0.10	0.08 ± 0.08	0.31 ± 0.13	0.23 ± 0.12
克隆后代	28	10.82 ± 0.67	9.82 ± 0.63	0.25 ± 0.08	0.14 ± 0.07	0.43 ± 0.11	0.18 ± 0.07
供体后代	7	11.00 ± 0.93	9.43 ± 1.09	0.29 ± 0.29	0.29 ± 0.29	0.86 ± 0.26	0.14 ± 0.14

2.4 克隆猪后代生产性能测定

克隆和供体公猪后代在断奶后集中调到测定站进行体重为 30 ~ 100 kg 时的生长性能测定,最终克隆猪后代 22 头数据有效,供体 11 头,具体结果见表

3。经协方差统计分析,克隆猪后代与供体后代相比,其总采食量、日均采食量、日均增重、料肉比、背膘和估计瘦肉率均没有显著差异,说明克隆猪具备供体的优秀性能并能遗传给下一代。

表 3 克隆和供体公猪后代生长性能测定结果

组别	样本/头	总采食量/kg	日均采食量/kg	日均增重/kg	料肉比	背膘厚/mm	估计瘦肉率/%
PD03 后代	10	183.33 ± 10.29	1.95 ± 0.09	0.85 ± 0.03	2.29 ± 0.08	16.91 ± 0.85	61.75 ± 0.80
PD05 后代	12	173.98 ± 11.07	1.85 ± 0.11	0.85 ± 0.03	2.18 ± 0.09	16.07 ± 0.97	62.70 ± 0.92
克隆后代	22	179.08 ± 8.22	1.91 ± 0.09	0.85 ± 0.02	2.24 ± 0.07	16.64 ± 0.68	62.08 ± 0.65
供体后代	11	173.06 ± 13.51	1.93 ± 0.13	0.82 ± 0.04	2.33 ± 0.11	15.49 ± 0.99	63.65 ± 0.93

3 讨论与结论

本研究评估了克隆皮杜公猪的繁殖性能和后代的生长性能,通过与供体比较,结果证明克隆猪保留了供体的优良特征。这一研究结果表明,利用体细胞克隆技术获得的个体具有良好的遗传资源价值。

克隆猪生产的影响因素很多,尤其重编程调控的机理尚未明确^[13],因此目前利用效率仍较为低下^[14],且克隆猪体质差、存活率低^[15],因此虽然有很多进行克隆效率研究的报道,但存活到成年的克隆猪仍然较少^[16]。本试验移植了 550 枚克隆胚胎,获得 5 头克隆猪,最终 2 头正常生长到采精和配种,除样本数少之外,可能也与使用的供体为皮杜猪有关^[5]。虽然有 3 头由于未知原因在断奶前死亡,但存活的 2 头均正常生长,直至配种均未出现异常情况,说明只要能够存活,克隆动物的健康不会出现异常状况,符合前人研究的结果^[17]。

公猪精液质量与本身的健康、日龄、性能及所处的环境有关^[18]。本试验中 2 头克隆猪和供体并不来源于同一个公猪站,且供体猪日龄大于克隆猪,因此克隆猪和供体精液质量并未直接进行比较,而是与同一猪舍的日龄相近的皮杜公猪进行比较。从结果来看,克隆猪的精液量、精子活力、畸形率均优于非克隆皮杜公猪,但差异并不显著,这与早期的研究

结果一致^[9],但是克隆公猪的精子密度显著高于对照组,可能原因是供体本身比较优秀。而且 2 头克隆猪精液指标的变异系数低,说明 2 头克隆猪的一致性较高,这与 Chen 等^[11]的报道不一致,可能本试验的克隆猪在发育过程中重编程调控比较彻底,导致表观遗传差异较小^[19]。为了进一步证实克隆猪的受精能力,采集克隆和供体猪的精液,然后分别对随机挑选的母猪进行人工授精,统计与配母猪的窝均产总仔数、活仔数等数量指标,2 头克隆猪与供体之间无显著差异,这与早期的报道也是一致的^[16, 20]。

克隆种畜的目标就是获得具有优良供体表型的后代^[21],对于种猪而言,其克隆繁殖的后代是否比非克隆猪更具有优势值得研究。从克隆后代的生长性能测定结果来看,在日增重、料肉比以及背膘厚等性状方面,克隆后代与供体后代相似,虽然统计上无显著差异,但克隆猪后代的料肉比要低于供体后代,这可能与供体日龄较大有关^[22]。克隆后代在生长性能方面的优势,也说明克隆猪保留了供体优秀的表型并能遗传给下一代。

自 2018 年以来,非洲猪瘟席卷中国大江南北,不仅给养猪业带来了巨大的经济损失,也对孱弱的中国地方猪造成了相当大的冲击,许多优良的遗传资源还可能会因此永远丢失。克隆技术具有保存优良遗传性状的潜力,有利于养猪业种质资源的保存,

包括商品种猪和地方猪种源。但克隆技术在养猪业的应用还需要进一步的长期研究或更多的试验数据来支持。

参考文献:

- [1] YANG H, WU Z. Genome editing of pigs for agriculture and biomedicine[J]. *Front Genet*, 2018, 9: 360.
- [2] LIU Z, CAI Y, WANG Y, et al. Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer [J]. *Cell*, 2018, 172(4): 881-887.
- [3] PERLEBERG C, KIND A, SCHNIEKE A. Genetically engineered pigs as models for human disease [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(1): dmm030783.
- [4] EGERER S, FIEBIG U, KESSLER B, et al. Early weaning completely eliminates porcine cytomegalovirus from a newly established pig donor facility for xenotransplantation [J]. *Xenotransplantation*, 2018, 25(4): e12449.
- [5] LI Z, SHI J, LIU D, et al. Effects of donor fibroblast cell type and transferred cloned embryo number on the efficiency of pig cloning [J]. *Cell Reprogram*, 2013, 15(1): 35-42.
- [6] YANG X, TIAN X C, KUBOTA C, et al. Risk assessment of meat and milk from cloned animals[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(1): 77-83.
- [7] TIAN X C, KUBOTA C, SAKASHITA K, et al. Meat and milk compositions of bovine clones [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(18): 6261-6266.
- [8] RUDENKO L, MATHESON J C, SUNDLOF S F. Animal cloning and the FDA: The risk assessment paradigm under public scrutiny[J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(1): 39-43.
- [9] KAWARASAKI T, ENYA S, OTAKE M, et al. Reproductive performance and expression of imprinted genes in somatic cell cloned boars [J]. *Anim Sci J*, 2017, 88(11): 1801-1810.
- [10] ADACHI N, YAMAGUCHI D, WATANABE A, et al. Growth, reproductive performance, carcass characteristics and meat quality in F1 and F2 progenies of somatic cell-cloned pigs[J]. *J Reprod Develop*, 2014, 60(2): 100-105.
- [11] CHEN C H, JIANG B H, HUANG S Y, et al. Genetic polymorphisms, growth performance, hematological parameters, serum enzymes, and reproductive characteristics in phenotypically normal Landrace boars produced by somatic cell nuclear transfer[J]. *Theriogenology*, 2013, 80(9): 1088-1096.
- [12] SHI J, ZHOU R, LUO L, et al. Influence of embryo handling and transfer method on pig cloning efficiency [J]. *Anim Reprod Sci*, 2015, 154: 121-127.
- [13] MATOBA S, ZHANG Y. Somatic cell nuclear transfer reprogramming: Mechanisms and applications [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(4): 471-485.
- [14] LIU Y, LI J, LØVENDAHL P, et al. In vitro manipulation techniques of porcine embryos: A meta-analysis related to transfers, pregnancies and piglets[J]. *Reprod, Fert Develop*, 2015, 27(3): 429.
- [15] SCHMIDT M, WINTHER K D, SECHER J O, et al. Postmortem findings in cloned and transgenic piglets dead before weaning [J]. *Theriogenology*, 2015, 84(6): 1014-1023.
- [16] HU K, KONG Q, ZHAO Z, et al. Assessment of reproduction and growth performance of offspring derived from somatic cell cloned pigs[J]. *Anim Sci J*, 2012, 83(9): 639-643.
- [17] SINCLAIR K D, CORR S A, GUTIERREZ C G, et al. Healthy ageing of cloned sheep[J]. *Nat Commun*, 2016(7): 12359.
- [18] WILLIAMS N E, WALKER S C, REEVES D E, et al. A comparison of reproductive characteristics of boars generated by somatic cell nuclear transfer to highly related conventionally produced boars [J]. *Cloning stem cells*, 2006, 8(3): 130.
- [19] DE MONTERA B, EL Z D, MULLER S, et al. Quantification of leukocyte genomic 5-methylcytosine levels reveals epigenetic plasticity in healthy adult cloned cattle [J]. *Cell Reprogram*, 2010, 12(2): 175-181.
- [20] LIU H, LV P, HE R, et al. Cloned Guangxi bama minipig (*Sus scrofa*) and its offspring have normal reproductive performance[J]. *Cell Reprogram*, 2010, 12(5): 543-550.
- [21] MONTAZER-TORBATI F, BOUTINAUD M, BRUN N, et al. Differences during the first lactation between cows cloned by somatic cell nuclear transfer and noncloned cows[J]. *J Dairy Sci*, 2016, 99(6): 4778-4794.
- [22] SLOTER E, NATH J, ESKENAZI B, et al. Effects of male age on the frequencies of germinal and heritable chromosomal abnormalities in humans and rodents [J]. *Fertil Steril*, 2004, 81(4): 925-943.