

ГЕНЕТИКА, БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ВІДТВОРЕННЯ У ТВАРИННИЦТВІ

УДК 636.4:57.086.13

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ ЕФЕКТИВНОСТІ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ООЦИТ-КУМУЛЮСНИХ КОМПЛЕКСІВ СВИНОК ПОРОДИ ВЕЛИКА БІЛА

Т.В. Галицька, Інститут розведення і генетики тварин НААН України

П.А. Троцький, к.с.-г.н., Інститут розведення і генетики тварин НААН України

Проведено порівняльний аналіз індивідуальних особливостей ооцит-кумулясних комплексів свинок породи велика біла при кріоконсервуванні та морфологічну і цитогенетичну оцінку отриманих *in vitro* ембріонів свиней. Встановлено, що індивідуальні особливості впливають на рівень формування ембріонів *in vitro* отриманих із деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин.

На сучасному етапі розвитку комплексних агробіотехнологій проблема тривалого збереження гамет і ембріонів тварин займає одне з головних місць. Основна система прискорення репродукції тварин з використанням методів штучного осіменіння і кріоконсервування гамет безпосередньо пов'язана з використанням низьких температур, успішне застосування яких неможливо без знання механізмів їх впливу на структуру та функціональну цілісність біологічних об'єктів. Практичне застосування розробок з біотехнології відтворення вимагають більш глибоких фундаментальних знань гаметогенезу та ембріонального розвитку сільськогосподарських тварин. Згідно "Програми збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року" розробка методів збереження генетичного потенціалу не лише чистопородного поголів'я, але й нових високопродуктивних ліній та окремих високоцінних тварин є досить актуальною. Застосування у практиці відтворення тварин нової технології отримання ембріонів *in vitro* з використанням деконсервованих ооцитів забезпечить раціональне використання генетичного потенціалу високопродуктивних і цінних у племінному відношенні самиць і отримувати від них більшу кількість потомства [1, 2, 3, 4].

Актуальним напрямом біотехнологічних досліджень на клітинному рівні є методи збереження і використання біорізноманіття в тваринництві із застосуванням аналізу *in vitro* раннього ембріонального розвитку. Нині система культивування і запліднення деконсервованих і дозрілих поза організмом ооцит-кумулясних комплексів самок є основною при одержанні ембріонів *in vitro* для розробки біотехнологічних методів відтворення тварин. Одним із важливих елементів одержання необхідної кількості зародків *in vitro* із деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин є вивчення індивідуальних особливостей ооцит-кумулясних комплексів самок під час кріоконсервування. В найближчій перспективі ці методи покликані сприяти вирішенню низки завдань щодо поглиблення генотипової оцінки тварин, збереження і раціонального використання генофонду порід на

основі методології функціонування банків генетичних ресурсів тварин [5, 6, 7, 8].

Метою наших досліджень було вивчити вплив індивідуальних особливостей ооцит-кумулясних комплексів свинок породи велика біла під час кріоконсервування на їх життєздатність та подальший розвиток ембріонів *in vitro*.

Матеріали і методи. Дослідження виконано з використанням біологічного матеріалу свиней із СВАТ «Агрокомбінат «Калита». Ооцит-кумулясні комплекси свинок отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів яєчників, вимивали середовищем Дюльбекко та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування використовували ооцити свинок із гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом. Перед заморожуванням гамети обробляли 10 хв. еквілібраційним розчином (10 % гліцерин + 20 % пропандіол), потім перенесли у вітрифікаційний розчин (25 % гліцерин + 25 % пропандіол). Еквілібраційний та вітрифікаційний розчини були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20 % сироватки крові корів, яку попередньо інактивували при +56°C протягом 30 хв. Після розморожування гамет виведення кріопротекторів проводили шляхом перенесення їх на 10 хв. у розчин 1,0 М сахарози. Потім клітини тричі відмивали середовищем М-199, оцінювали за морфологічними ознаками і перенесли в середовище для культивування. Ооцит-кумулясні комплекси свинок культивували в чотирьохлункових планшетах упродовж 44 год. За температури +38,5°C, 5 % CO₂ у повітрі, в середовищі 199 з 20 % попередньо інактивованою еструсною сироваткою крові корів, 2,0 мМ натрію пірувату, 2,92 мМ кальцію лактату, 40 мкг/мл гентаміцину. Деконсервовані гамети свинок після культивування поза організмом підлягали заплідненню *in vitro*. Для запліднення *in vitro* яйцеклітин свинок використовували нативну сперму кнура (№ 845). Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J.J. et al. [9]. Після 12 – 18 год. спільного інкубування

яйцеклітини і зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища CDM для подальшого культивування. Цитогенетичні препарати гамет свинок після запліднення *in vitro* та зародків свиней готували за методом Ushijima M. et al. [10], забарвлювали 2,0 %-м розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

Результати власних досліджень.

Відомо, що вилучені з антральних фолікулів ооцит-кумулясні комплекси тварин характеризуються значною різноманітністю як за зовнішніми ознаками (стан клітин кумулюсу і внутрішньоклі-

тинної маси) так і за фізіологічними властивостями (стійкість до дії низьких температур). Проведено порівняльний аналіз індивідуальних особливостей таких ооцит-кумулясних комплексів свинок за результатами подальшого розвитку ембріонів *in vitro* (табл.). В дослідженнях використано ооцити від дев'яти свинок породи велика біла. Отримані гамети від кожної свинки розподіляли на 2 групи: дослідну (Д), в якій ооцит-кумулясні комплекси підлягали кріоконсервуванню та контрольну (К), де ооцит-кумулясні комплекси свинок не заморожували.

Результати запліднення деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок породи велика біла

№ п/п	Варіанти досліджу	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях					
			2 клітин		3-4 клітин		5-8 клітин	
			n	%	n	%	n	%
1	Д	36	4	11,1 ^a ±5,2	2	5,6 ^a ±3,8	1	2,8 ^a ±2,7
	К	21	6	28,6 ^a ±9,9	4	19,0 ^a ±8,6	1	4,8 ^a ±4,6
2	Д	33	7	21,2 ^b ±7,1	3	9,1 ^a ±5,0	1	3,0 ^a ±2,9
	К	29	13	44,8 ^c ±9,2	8	27,6 ^a ±8,3	5	17,2 ^a ±7,0
3	Д	51	9	17,6 ^b ±5,3	4	7,8 ^b ±3,8	2	3,9 ^a ±2,7
	К	28	11	39,3 ^c ±9,2	9	32,1 ^c ±8,8	4	14,3 ^a ±6,6
4	Д	45	12	26,7 ^b ±6,6	8	17,8 ^b ±5,7	4	8,9 ^a ±4,2
	К	44	21	47,7 ^c ±7,5	18	41,0 ^c ±7,4	9	20,5 ^a ±6,1
5	Д	42	2	4,8 ^d ±3,3	1	2,4 ^f ±2,3	0	0,0 ^a ±0,0
	К	19	10	52,6 ^e ±11,5	7	36,8 ^g ±11,1	3	15,8 ^a ±8,4
6	Д	45	4	8,9 ^d ±4,2	3	6,7 ^f ±3,7	1	2,2 ^b ±2,1
	К	22	11	50,0 ^e ±10,7	8	36,4 ^g ±10,3	5	22,7 ^c ±8,9
7	Д	37	6	16,2 ^a ±6,1	5	13,5 ^a ±5,6	4	10,8 ^a ±5,1
	К	14	6	42,9 ^a ±13,2	5	35,7 ^a ±12,8	3	21,4 ^a ±10,9
8	Д	34	5	14,7 ^a ±6,1	4	11,8 ^a ±5,5	2	5,9 ^a ±4,0
	К	12	5	41,7 ^a ±14,2	4	33,3 ^a ±13,6	3	25,0 ^a ±12,5
9	Д	45	5	11,1 ^a ±4,7	3	6,7 ^a ±3,7	1	2,2 ^a ±2,1
	К	19	6	31,6 ^a ±10,7	5	26,3 ^a ±10,1	2	10,5 ^a ±7,0

b : c – P < 0,05; f : g – P < 0,01; d : e – P < 0,001, критерій Стьюдента.

За результатами експериментальних досліджень встановлено, що індивідуальні особливості мають вплив на рівень формування ембріонів *in vitro*, які отримували із деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин. При заплідненні *in vitro* таких яйцеклітин свинок і подальшого 24-годинного культивування у 55,6 % спостерігали статистично вірогідну різницю між дослідною і контрольною групами. Аналіз результатів контрольних груп виявив, що після запліднення дозрілих яйцеклітин та подальшого культивування ембріонів спостерігали статистично вірогідну різницю між групами у 11,1 % випадках. Необхідно звернути увагу й на той факт, що при проведенні порівняльного аналізу дослідних груп не встановлено статистично вірогідної різниці між групами за такими показниками як кількість отриманих ембріонів після запліднення *in vitro* деконсерво-

ваних і дозрілих яйцеклітин свинок. При збільшенні терміну культивування ембріонів до 48 год. спостерігали зменшення на 11,2 % кількості випадків при отриманні ембріонів між дослідною і контрольною групами. На третю добу культивування ембріонів отриманих з деконсервованих, дозрілих та запліднених поза організмом яйцеклітин свинок також спостерігали тенденцію зменшення кількості отриманих зародків. На цей період культивування тільки у 1 випадку спостерігали вірогідну різницю між дослідною і контрольною групами.

Аналізуючи результати експериментальних досліджень дроблення загальної кількості ембріонів свиней великої білої породи (рис.) встановлено статистично вірогідну різницю (P < 0,001) між дослідною і контрольною групами через 24 – 72 год. культивування.

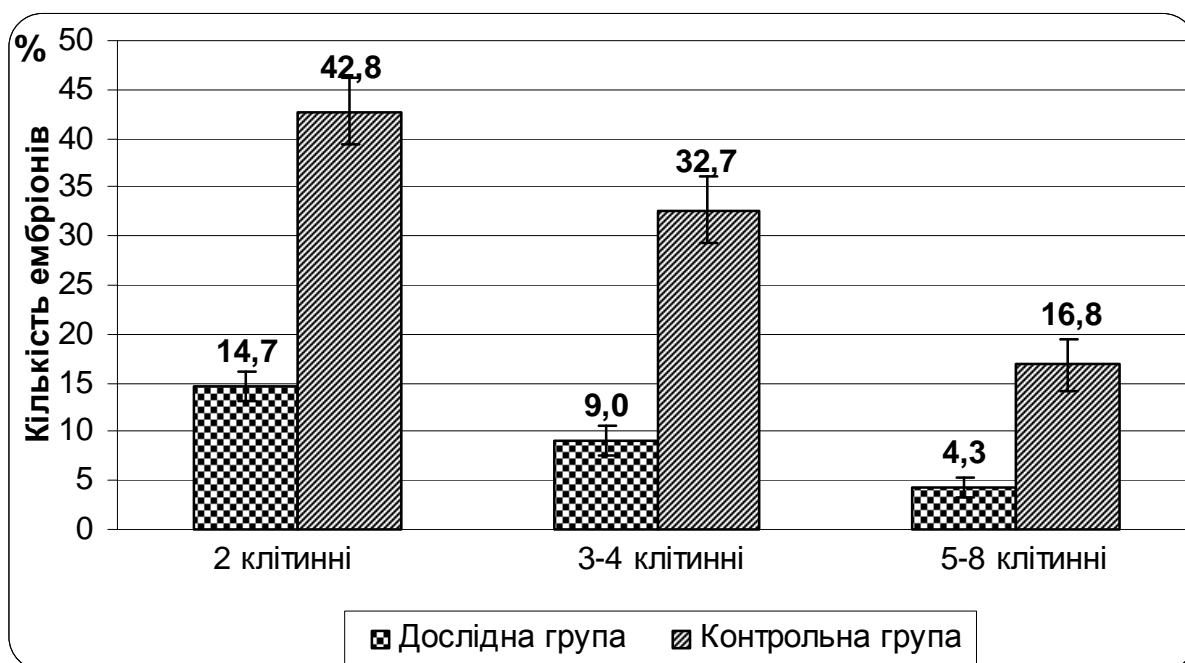


Рис. Результати дроблення загальної кількості ембріонів свиней породи велика біла

Таким чином, при вивченні індивідуальних особливостей ооцит-кумулясних комплексів свинок породи велика біла під час кріоконсервування встановлено різну їх ефективність. За результатами експериментальних досліджень встановлено, що майже у половини (44,6 %) дослідних груп не встановлено наявності взаємозв'язку кріорезистентності ооцит-кумулясних комплексів свинок породи велика біла між дослідною та контрольною групами за таких показників як кількість отриманих зародків. Вивчення життєздатності деконсервованих гамет та подальшого розвитку ембріонів *in vitro* показало, що індивідуальні особливості ооцит-кумулясних комплексів свинок породи велика біла є фактором, який впливає на результативність кріоконсервування.

Висновки. Для збереження та раціонального використання племінних (генетичних) ресурсів у свинарстві необхідно створювати кріобанки гамет для довгострокового зберігання з метою подальшої реалізації їх для відтворення. Кріорезистентність ооцит-кумулясних комплексів свинок породи велика біла залежить від індивідуальних особливостей життєздатності гамет. Встановлено, що індивідуальне (від кожної тварини окремо) кріоконсервування ооцит-кумулясних комплексів свинок породи велика біла та подальше культивування ембріонів призводить у 55,6 % випадках до відмінностей між дослідною і контрольною групами та у 11,1 % випадках між контрольними групами.

Список використаної літератури:

1. Методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин /М.В. Зубець, В.П. Буркат, Ю.Ф. Мельник та ін., Наук. Ред. І.В. Гузев. – К.: Аграрна наука, 2007. – 120 с.
2. Ковтун С.І. Нові біотехнологічні методи збереження генетичних ресурсів тварин / С.І. Ковтун // Проблеми збереження генофонду тварин : матеріали творчої дискусії . – К.: Аграрна наука, 2007. – С 44-45.
3. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue / E.J.Woods, J.D.Benson, Y.Agsa, J.K.Crister // Cryobiology.- 2004.- Vol.48.- P.146-156.
4. Програма збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року / заг. наук. ред. І.В. Гузева, консультація та специфікація Ю.Ф. Мельника. – К.: Арістей, 2009. – 132 с.
5. Seidel G.E., Jr. Modifyng oocytes and embryos to improve their cryopreservation // Theriogenology.- 2006.- Vol.65, I.1.- P.228-235.
6. Gupta M.K., Uhm S.J., Lee H.T. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification // Theriogenology.- 2007.- Vol.67, I.2.- P.238-248.
7. Щербак О.В. Біотехнологічні методи одержання і зберігання гамет сільськогосподарських тварин / Щербак О.В., Троцький П.А., Зюзюн А.Б. // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. праць. – К.: Логос, 2008. – Т.5. – С. 463–467.

8. Галицька Т.В. Особливості вивчення кріорезистентних властивостей ооцит-кумулюсних комплексів свинок різних порід / Т.В. Галицька, П.А. Троцький // Науково-технічний бюлетень. – Львів, 2011. – Вип.12, №. 1, 2– С. 228-332.

9. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid / Parrish J.J., Susko-Parrish J.L., Handron R.R. [et al.] // Biol.Reprod.– 1989.– V.40.– P. 1020–1025.

10. Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts / Ushijima M., Okuda M., Nakajama T. [et al.] // Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans.- 1988.– №9.– P. 37–38.

Проведено сравнительный анализ индивидуальных особенностей ооцит-кумулюсных комплексов свинок породы большая белая при криоконсервировании, а также морфологическую и цитогенетическую оценку полученных in vitro эмбрионов свиней. Установлено, что индивидуальные особенности по разному влияют на уровень формирования эмбрионов in vitro полученных из деконсервованных и созревших вне организма яйцеклеток.

The comparative analysis of individual features is conducted oocyte-cumulus complexes piggy-wiggies of breed large white at cryopreservation and morphological and cytogenetic estimation of got in vitro embryos pigs. It is set that individual features on different influence on the level of forming embryos in vitro got from frozen-thawed and mature out of organism ovules.

Дата надходження в редакцію: 29.11.2012 р.

Рецензент: д.с.г.н., професор Г.П. Котенджи

УДК 636.2.082:575.2.

ГЕНЕТИЧНА МІНЛИВІСТЬ ГАМЕТ У БУГАЇВ І КОРІВ ПРИ РІЗНИХ РІВНЯХ КОНСОЛІДАЦІЇ ЇХ СПАДКОВОСТІ

І.П. Петренко, д.с.-г.н., Інститут розведення і генетики тварин НААН України

О.Д. Бірюкова, к.с.-г.н., Інститут розведення і генетики тварин НААН України

Проведено теоретичний аналіз ймовірного утворення генетичної різноманітності гамет у бугаїв і корів за адитивним генетичним потенціалом активності (А.Г.П.А.) хромосом при різних рівнях консолідації їх спадковості.

Відбір і підбір тварин в породі, популяції за показниками племінної цінності їх селекційних ознак продуктивності, а також безпосередньо наявний стан їх спадковості – всіх гомологічних пар хромосом у тварин, а саме їх гетерологічність та консолідованість, є основними рушійними чинниками селекційного процесу в поколіннях потомства [1, 9, 10].

Теоретичне передбачення або визнання того, що кожна хромосома з гомологічної пари в каріотипі тварин в породі, популяції має більш за все різний, тобто одна більший (Б.) «+», а друга менший (М.) «-» адитивний (А.) генетичний (Г.) потенціал (П.) активності (А.) (гетерологічний стан всіх хромосом), або деякі з них рівний генетичний потенціал (консолідований стан певних хромосом) за впливом на прояв кількісних селекційних ознак продуктивності тварин дає можливість для пояснення та розуміння при відповідному моделюванні динаміки змін багатьох важливих селекційних процесів в породі, популяції [9, 10].

Вважаємо, що більший (Б.А.Г.П.А.«+») і менший (М.А.Г.П.А.«-») адитивний генетичний потенціал активності двох хромосом у всіх гомологічних пар каріотипу кожної тварини за впливом на прояв кількісних селекційних ознак продуктивності в породі, популяції створюється

реальною, об'єктивно наявністю різноманітного алельного складу чисельної кількості всіх функціонально активних локусів, алелей в них (хромосомах тварин), що беззаперечно, постійно підтверджується багатьма сучасними конкретними генетичними дослідженнями [2-8].

Зазначаємо, що менший (М.А.Г.П.А. «-») генетичний потенціал хромосоми з умовним позначенням «-» не означає, що цей адитивний потенціал має від'ємне значення і віднімається (-) в геномі гамети чи генотипі тварини. Ні, він завжди позитивний і тільки додається (+) до адитивного генетичного потенціалу інших хромосом з (Б.А.Г.П.А. «+» і М.А.Г.П.А. «-») потенціалом, що і створює сумарно загальний адитивний генетичний потенціал активності окремої гамети чи генотипу тварини в цілому в породі, популяції.

Метою даних досліджень були розробка методики, відповідних формул та теоретичний аналіз ймовірного утворення генетичної різноманітності гамет у різних видів тварин за кількісною мінливістю хромосом з Б.А.Г.П.А. «+» і М.А.Г.П.А. «-» адитивним генетичним потенціалом спадковості у повністю гетерогенних і частково консолідованих популяціях, яка б враховувала кількість пар хромосом (N) в їх каріотипах і їх реальній стан в генотипі тварин (гетерологічність і консолідованість).