

ных образцов фасоли // Исходный материал, селекция и систематика зерновых бобовых культур: сб. научн. тр. по прикл. бот., ген. и сел. – Л., 1985. – Т. 91. – С. 91–95.

3. Фасоль (оценка образцов на разваримость и другие хозяйственно ценные признаки): каталог мировой коллекции ВИР; сост.: В.В. Колотилов, Т.В. Буравцева, А.С. Колотилова [и др.]. – Л., 1991. – Вып. 606. – 20 с.
4. Пророшневая Р.К., Белехова А.К., Чмелева З.В. Технологические свойства гороха в условиях северо-запада Нечерноземной зоны РСФСР // Исходный материал, селекция и систематика зерновых бобовых культур: сб. научн. тр. по прикл. бот., ген. и сел. – Л., 1985. – Т. 91. – С. 96–100.
5. Комамов В.И. Технологическая оценка зерна гороха, чечевицы, фасоли: методические указания. – СПб.: ВИР, 1992. – 18 с.
6. Порешникова Р.К., Буравцева Т.В. Оценка образцов фасоли для селекции на разваримость // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – Л., 1997. – Т. 152. – С.106–108.
7. Технологическая оценка зерна гороха, чечевицы, фасоли: метод. Указания; под. ред. В.И. Комаровой и Р.К. Прорешневой. – С.-Пб., 1992. – 17 с.

#### **KOBYZEVA L.N.**

*Plant Production Institute n.a. V.Ya. Yuriev of NAAS*

*Ukraine, 61060, Kharkiv, Moskovskiy Avenue, 142, e-mail: lubov\_kobyzeva@mail.ru*

#### **THE SOURCE MATERIAL FOR BREEDING OF LEGUMINOUS PLANTS WITH IMPROVED TECHNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SEEDS**

**Aims.** The article introduces results of many years studying (1994–2009 yy.) of collection samples of pea, bean, chick-pea and lentil of the National centre of studying genetic plant resources of Ukraine by technological indices of seeds – time of boiling and overcooking coefficient. **Methods.** The determination of technological characteristics of seeds of leguminous plants (overcooking and taste qualities) have been determined by commonly accepted methodology (1992 y.). **Results.** It has been determined that as for the time of boiling, all the studied crops are characterized by considerable range, that confirms the wide range of input material for working-off in the selective plan of this characteristic. Depending on crops, the overcooking coefficient was changing from 1,6 till 5,7; depending on weather conditions it was not stable (V from 6 % till 18,47 %). The samples of pea have been defined as the highest overcooking coefficient. **Conclusions.** The collection samples of bean (V=18,47 %) and pea (V=18,26 %) are characterized by the biggest changeability of the overcooking coefficient. Most of samples has had satisfactory and good time of boiling: pea (35,48 %, 39,67 %), bean (53,8 %, 33,7 %), and chick-pea (49,4 %, 42,1 %) accordingly, in lentil the studied samples have had good (53,5 %) and excellent (37,5 %) time of boiling.

*Key words:* collection samples of pea, bean, chick-pea and lentil, sources, overcooking coefficient.

#### **КОВТУН С.І., ЩЕРБАК О.В., ТРОЦЬКИЙ П.А., ГАЛИЦЬКА Т.В., ЗЮЗІОН А.Б.**

*Інститут розведення і генетики тварин НААН*

*Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,*

*e-mail: ov19792006@yandex.ru*

#### **ЗАСТОСУВАННЯМ НАНОМАТЕРІАЛІВ У СИСТЕМІ ЗБЕРЕЖЕННЯ БІОРІЗНОМАНІТТЯ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН УКРАЇНИ**

Науково-технічний прогрес початку ХХІ сторіччя відзначається зростанням інтересу до технологій, що базуються на принципах самоорганізації. Такі технології отримали назву «нанотехнології». Синтетичні наночастки, набувають широкого застосування в різних галузях виробництва, а також у біології та медицині. Зокрема, наночастки високодисперсного кремнезему (ВДК) не перевищують 100 нм, що дозволило широко використовувати цей компонент у різ-

них лікарських препаратах [1–3]. Завдяки фізико-хімічним властивостям поверхні ВДК можливе його використання як матриці для синтезу наноматеріалів (НМ), які володіють високою біологічною активністю.

Наразі потребують вирішення питання розробки нових кріосередовищ, які містять наноматеріали для збереження гамет та ембріонів сільськогосподарських тварин. Оскільки згідно «Програми збереження генофонду основних ви-

дів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року» генофондові стада є виробниками продукції у вигляді гамет, ембріонів та соматичних клітин, необхідно регульовано використовувати таку продукцію на різних етапах комплексу заходів збереження генофонду через функціонування Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин НААН. Ефективність роботи його залежить від розподілу генетичного матеріалу у віртуальні генофондові кріостада, які мають кріоконсервованій генетичний матеріал відомого походження та у кількості, яка є достатньою для відтворення генофондового стада тварин. Ці підходи є складовою виконання у найближчі роки завдань цілісної наукової методології, державної програми дій щодо збереження біорізноманіття тваринництва та міжнародних документів, підписаних Україною («Конвенція про біологічну різноманітність» (Ріо-де-Жанейро, 1992), «Інтерлакенська декларація та глобальний план дій щодо збереження, сталого використання і розвитку генетичних ресурсів тварин у світі для продовольства і сільського господарства» (Швейцарія, ФАО, 2007), Нагойського протоколу про доступ до генетичних ресурсів та справедливий і рівноправний розподіл вигоди від їх використання (Японія, 2010)).

Необхідна також розробка технологічного маршруту виготовлення наноматеріалів та подальшого вивчення їх біологічної активності для підвищення життєздатності репродуктивних

### Матеріали і методи

Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулюсні комплекси свинок порід велика біла та ландрас. Сперматозоїди кнурів та яйцеклітини свиней одержували на СВАО «Агрокомбінат «Калита» (Броварський р-н). Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, 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 переносили у вітрифікаційний розчин (25 % гліцерин +25 % пропандіол).

Після розморожування гамет свинок виведення кріопротекторів проводили шляхом перенесення їх на 10 хв. у розчин 1 М сахарози.

клітин у технології кріоконсервації не тільки сперми плідників, але й гамет самиць. Стрімкий розвиток нанотехнологій та зростання обсягів виробництва наноматеріалів визначають необхідність розробки нової технології довгострокового зберігання генетичних ресурсів тварин на основі використання наноматеріалів [4–6].

Такі дослідження є перспективними та були представлені як складова плану дій на засіданні робочої групи Європейського регіонального центру генетичних ресурсів тварин при ФАО, членом якого є Україна, в рамках функціонування Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин НААН із використанням міжнародної програми управління кріобанками CryoWEB. Технологія буде застосована в рамках виконання Національного проекту Міністерства аграрної політики та продовольства України «Відроджене скотарство» в частині збільшення поголів'я вітчизняних порід і забезпечить економічний ефект у частині зниження вартості кріоконсервованих генетичних ресурсів і підвищення рівня одержання потомства.

Метою досліджень було вивчити вплив 0,001 %-ї концентрації ВДК 200°C (поверхня ВДК перед експериментом була оброблена протягом двох годин температурою 200°C) на життєздатність та подальший розвиток поза організмом ембріонів, отриманих із деконсервованих гамет свиней.

Потім клітини тричі відмивали середовищем М-199, оцінювали за морфологічними ознаками і переносили в середовище для культивування. Ооцит-кумулюсні комплекси свинок культивували в чотирьохлункових планшетах упродовж 44 год. за температури +38,5°C, 5 % CO<sub>2</sub> у повітрі, в краплях середовища 199 з 10 % попередньо інактивованою еструсною сироваткою корів, 2 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 кнурів. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J.J. et al. [7]. Після 12–18 год. спільного інкубування яйцеклітини і зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища CDM для подальшого культивування.

## Результати та обговорення

Підбір і використання певних добавок при культивуванні гамет в умовах *in vitro* є одним з визначальних чинників, які забезпечують життєздатність і подальший розвиток поза організмом як нативних так і деконсервованих гамет. Нами проведені експериментальні дослідження з вивчення впливу добавки ВДК 200°C в 0,001 %-й концентрації на життєздатність і подальший розвиток поза організмом ембріонів отриманих з деконсервованих гамет. При цьому НМ додавали до деконсервованих та запліднених яйцеклітин (зигот) свиней (варіант досліду – Д). Як контроль були зиготи, які культивувалися *in vitro* без додавання НМ (варіант досліду – К).

Попередніми дослідженнями було встановлено, що рівень формування ембріонів свиней із додаванням до середовища для культивування зародків *in vitro* 0,001 % ВДК 200 °С є досить високим і цей рівень становив 40,2 %. Показник дроблення ембріонів *in vitro* був на 3,8 % нижче у контрольній групі, порівняно із середовищем

яке містило 0,001 % ВДК 200°C [9]. Також нами отримано вищий відсоток дозрілих *in vitro* до метафази II ооцитів свиней, які культивувалися із 0,01 % ВДК 200°C (69,6 % проти 56,5 % без додавання НМ) [10, 11].

Нами проведено дослідження із удосконалення елементів технології довгострокового зберігання генетичних ресурсів тварин на основі використання наноматеріалів для удосконалення ембріотехнологічних засобів у тваринництві. Встановлено, що рівень дроблення *in vitro* ембріонів свиней із деконсервованих гамет за використання 0,001 %-ї концентрації НМ у середовищі їх культивування був вищим на 11,1 %, порівняно з контролем (табл. 1).

Встановлено, що відсоток формування ембріонів на більш пізніх стадіях розвитку *in vitro* (ранні морули – 9 – 16-клітинні ембріони) в дослідній групі з додаванням 0,001 %-ї концентрації НМ у середовище для культивування ембріонів.

Таблиця 1. Вплив ВДК 200 °С на ефективність розвитку ембріонів свиней *in vitro*, отриманих із деконсервованих яйцеклітин свинок

Варіанти досліду	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадіях:							
		2 клітин		3–4 клітин		5–8 клітин		9–16 клітин	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Д	155	57	36,8 <sup>a</sup> ±3,9	46	29,7 <sup>a</sup> ±3,7	28	18,1 <sup>c</sup> ±3,1	13	8,4 <sup>d</sup> ±2,2
К	148	38	25,7 <sup>b</sup> ±3,6	27	18,2 <sup>b</sup> ±3,2	17	11,5 <sup>c</sup> ±2,6	7	4,7 <sup>d</sup> ±1,7

Примітка. a : b – P < 0,05, критерій  $\chi^2$ .

Встановлено, що 0,001 % концентрація ВДК 200°C позитивно впливає на подальший розвиток запліднених *in vitro* деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин (рис. 1). Досліджуючи динаміку дроблення ембріонів свиней (кількість ембріонів на відповідній стадії розвитку від загальної кількості ембріонів – 95 штук) нами встановлено, що через 24 год. культивування рівень дроблення ембріонів був вищий у дослідній групі на 20 %, порівняно із контрольною. Подальше культивування ембріонів до 48 год. призводить до зниження динаміки дроблення в контрольній групі також на 20 %, порівняно з дослідною. На третю добу культивування цих ембріонів рівень дроблення зменшився більш як у два рази в обох групах і стано-

вив у середньому 23,8 %. При збільшенні терміну культивування ембріонів до 96 год. спостерігали зменшення рівня дроблення в дослідній та контрольній групах більш ніж у п'ять разів.

Крім динаміки дроблення зародків після запліднення *in vitro* не меншу інформативність має індекс дроблення ембріонів (кількість ембріонів на відповідній стадії розвитку від загальної кількості ембріонів у кожній групі). Встановлено, що індекс дроблення 3–4-клітинних ембріонів був вищий у дослідній групі на 9,6 %, порівняно з контролем (рис. 2). При подальшому дробленні ембріонів (5–8-клітинні) спостерігали зниження індексу дроблення у дослідній групі на 2,1 %, порівняно із контролем.

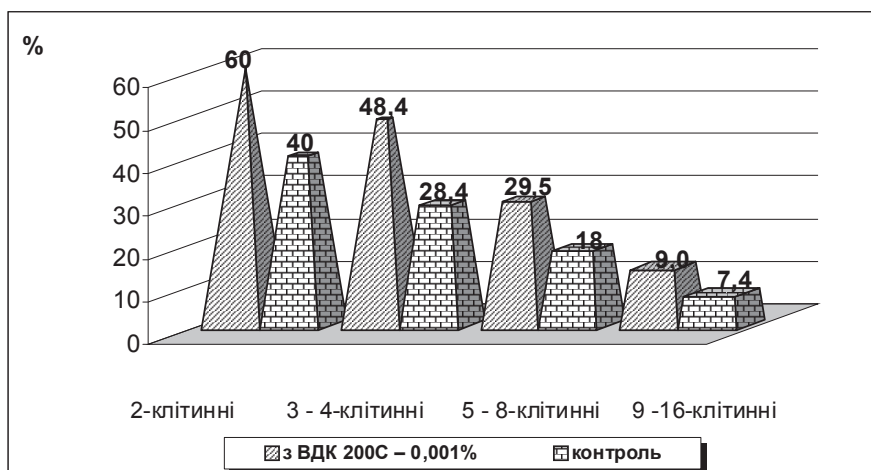


Рис. 1. Динаміка дроблення ембріонів свиней, отриманих *in vitro* з деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин

При подальшому культивуванні було відмічено збільшення відповідного індексу в дослідній групі (9–16-клітинні ембріони) на 5,2 %, порівняно із контролем.

Отже, встановлено позитивний вплив ВДК 200°C в концентрації 0,001 % на формування ембріонів із деконсервованих ооцитів та подальший їх розвиток в умовах *in vitro* і отримано

вірогідно більшу кількість ембріонів (9 %), які розвинулись до стадії морули. Встановлена перевага використання ВДК 200 °C в 0,001 %-вій концентрації при формуванні ембріонів *in vitro* за таких показників як кількість отриманих зародків із деконсервованих і дозрілих яйцеклітин свинок.

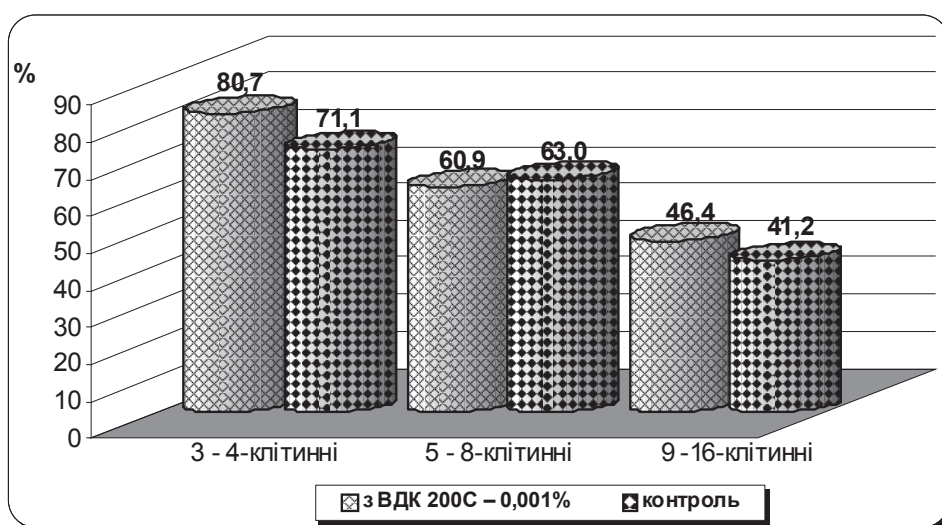


Рис. 2. Індекс дроблення ембріонів свиней, отриманих *in vitro* з деконсервованих і дозрілих поза організмом яйцеклітин свинок

### Висновки

Доведено, що використання ВДК 200 °C в 0,001 %-й концентрації у складі середовища для *in vitro* культивування призводить до збільшення на 11,1 % кількості отриманих зародків свиней з деконсервованих ооцитів та забезпечує більш ефективне формування і розвиток ембріонів поза організмом.

Отримані результати вказують на доцільність більш глибокого з'ясування біологічних

процесів, враховуючи склад культуральних середовищ при формуванні ембріонів *in vitro* з деконсервованих яйцеклітин. Ця розробка є складовою реалізації завдань «Програми збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року» та Національного проекту Міністерства аграрної політики та продовольства України «Відроджене скотарство».

Робота виконана за фінансової підтримки Державного агентства з питань науки, інновацій та інформатизації України в рамках проекту «Розроблення нової технології довгострокового зберігання генетичних ресурсів тварин на основі використання наноматеріалів» (договір № ДЗ/496-2011 від 29.09.2011 р.).

### Література

1. Борисевич В.Б., Каплуненко В.Г., Косінов М.В. та ін. Наноматеріали в біології. Основи нановетеринарії. – К.: ВД «Авіцена», 2010. – 416 с.
2. Буркат В.П., Ковтун С.І. Сучасна біотехнологія у тваринництві // Біотехнологія. – 2008. – № 3. – С. 7–12.
3. Буркат В.П., Ковтун С.І., Галаган Н.П. Нанобиотехнологические методы для сохранения генофонда // Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии воспроизводства животных». – Дубровицы – Быково, 2007. – С. 450–452.
4. Ковтун С.І., Щербак О.В., Зюзюн А.Б. та ін. Використання наноматеріалів для ефективного формування ембріонів свиней *in vitro* // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр. – 2012. – Т. 4. – С. 513–518.
5. Галаган Н.П. Наноматеріали на основі високодисперсного кремнезема і біомолекул в середовищах з репродуктивними клітками // Материалы II Всеросс. научной конференции с международным участием «Сорбенты как фактор качества жизни и здоровья». – Москва–Белгород, 2006. – С. 55–59.
6. Галаган Н.П., Власенко В.В., Настасієнко Н.С., Чуйко О.О. Дослідження впливу високодисперсного кремнезему, модифікованого поліолами, на життєздатність репродуктивних клітин методом фотон-кореляційної спектроскопії // Біофізичний вісник. Вісн. Харк. ун-ту. – 2005. – № 665, Вип. 1 (15). – С. 94–98.
7. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid /Parrish J.J., Sushko-Parrish J.L., Handron R.R. et al. // Biol.Reprod. – 1989. – Vol.40. – P.1020–1025.
8. Ushijima M., Okuda M., Nakajama T. et al. Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts // Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans. – 1988. – №9. – P. 37–38.
9. Ковтун С.І., Щербак О.В., Зюзюн А.Б. та ін. Використання наноматеріалів для ефективного формування ембріонів свиней *in vitro* // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр. – 2012. – Т. 4. – С. 513–518.
10. Ковтун С.І., Куновський Ю.В., Галаган Н.П. Вплив наноматеріалів на заплідненість яйцеклітин свиней // Тваринництво України. – 2007.– №2. – С. 72–74.
11. Galagan N.P., Siora I.V., Kovtun S.I., Scherbak O.V. Nanocomposites in biotechnology for prolonged preservation of gene pool (synthesis and application) // IX Polish – Ukrainian Symposium «Theoretical and experimental studies of interfacial phenomena and their technological applications». – Lublin. – P. 27.

**KOVTUN S.I., SCHERBAK O.V., TROTSKY P.A., GALITSKA T.V., ZYUZYUN A.B.**

*Institute of Animal Breeding and Genetics NAAS*

*Ukraine, 08321, Kyiv Region, Boryspil District, v. Chubinsky, Pogrebnjaka str., 1,*

*e-mail: ov19792006@yandex.ru*

### USE OF NANOMATERIALS IN FARM ANIMALS OF UKRAINE BIODEVERSITY CONSERVATION SYSTEM

**Aims.** Examine the impact of 0.001 %-concentrated ultrafine silica (UFS 200°C) on the viability and further development outside the organism of embryos, which were obtained from unfrozen gametes. **Methods.** Biotechnological, cryobiological, morphological, and methods of data statistical processing were used at research holding. **Results.** It was found that the use of UFS 200°C of 0.001 % concentration as the component for *in vitro* cultivation medium causes an increase of obtained pig embryos number at 11.1 %, when compare with fertilization of pig gametes without nanomaterial use. Dynamics of formation of *in vitro* pig embryos and fragmentation index of embryos, which were obtained out of unfrozen oocytes after adding of nanomaterials were specified. **Conclusions.** It is proved that UFS 200°C of 0.001 % concentration in the medium for *in vitro* cultivation of pig embryos, got out of unfrozen oocytes provides more efficient formation and development of embryos outside the organism. These approaches are part of the execution in the coming years of tasks of integrated scientific methodology, the state program of actions on animal-breeding biodiversity conservation and international documents, signed by Ukraine.

**Key words:** nanomaterials, cryoconservation, vitrifying solution, maturation *in vitro*, embryos.