

ЩЕРБАК О.В., ТРОЦЬКИЙ П.А., ЗЮЗІОН А.Б.

Інститут розведення і генетики тварин УААН,

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

e-mail: ov19792006@yandex.ru

БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ОДЕРЖАННЯ І ЗБЕРЕГАННЯ ГАМЕТ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН

Проблема збереження біологічного різноманіття рідкісних видів диких та зникаючих порід сільськогосподарських тварин має світове значення і зумовлює підвищену увагу до удосконалення методів одержання і збереження повноцінних гамет, придатних для отримання потомства. Метод кріоконсервування репродуктивних клітин ссавців, який вперше був запропонований у 1947 році Міловановим В.К., Соколовською І.І., Смирновим І.В., створив можливість довготривалого збереження генетичного матеріалу (сперми) тварин у замороженому стані. Збереження генетичних ресурсів рідкісних, зникаючих та унікальних видів тварин має значну наукову, інформаційну, економічну і медичну цінність. Ініціатором створення генетичних кріобанків і використання методів біології розвитку для збереження різних видів тварин був Б.М. Вепрінцев [1].

При збереженні генофонду тварин, які знаходяться на межі зникнення, привертає особливу увагу метод кріоконсервування сперматозоїдів, вилучених із придатків сім'яників (епідидимальні). У Всеросійському науково-дослідному інституті тваринництва створений банк кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів диких тварин (вівцебик, як, сайгак) [2].

Перспектива практичного використання генетичного матеріалу передбачає всебічне вивчення можливої побічної дії кріопротекторів, або їх багатокомпонентних сумішей. Особливу увагу приділяють цитотоксичній дії кріозахисних середовищ при вітрифікації у зв'язку із застосуванням високих концентрацій кріопротекторів. Наразі при проведенні експериментальних досліджень із заморожування зародків великої рогатої худоби, одержаних як *in vivo* так і *in vitro*, та гамет самиць корів, використовується широкий спектр кріопротекторів ендо- і екзоцелюлярної дії та різних їх співвідношень у вітрифікаційному розчині [3, 4, 5].

Метою досліджень було вдосконалити розроблені нами біотехнологічні методи кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів бугаїв та кнурів і незрілих ооцит-кумуляюсних комплексів (ОКК) корів для підвищення ефективності збереження генофонду тварин.

Матеріали і методи

Для досліджень використовували сім'яники бугаїв голштинської породи і кнурів великої білої породи. Сім'яники відділяли від мошонки після кастрації тварин і доставляли в лабораторію. В лабораторних умовах звільняли сім'яник від оболонки і відокремлювали хвіст придатка сім'яника (епідидиміса). Сперматозоїди вилучали шляхом розрізання хвостової частини епідидимісів скальпелем. Надрізи придатків робили у місці скупчення каналців, видавлюючи вміст і відбираючи отриману суміш сперматозоїдів. Для заморожування епідидимальних сперматозоїдів бугаїв у формі відкритих гранул використовували лактозо-гліцеріно-жовтковий розбавник (ЛГЖ), а для кнурів „Біоконсан”.

Іншим об'єктом експериментальних досліджень були ОКК корів. Їх одержували шляхом надрізу лезом антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування використовували ооцити корів з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неущкодженою прозорою оболонкою,

щільним або частково розпушеним кумулюсом. Перед заморожуванням гамети обробляли еквілібраційним розчином, потім переносили у вітрифікаційний розчин. Для заморожування ооцит-кумулюсних корів використовували п'ять різних вітрифікаційних розчинів: ВР - 1 – 40% етиленгліколю + 0,5 М сахарози + 18% фіколу (гр. А); ВР - 2 – 40% гліцерину + 0,5 М сахарози + 18% фіколу (гр. Б); ВР - 3 – 25% етиленгліколю + 25% диметилсульфоксиду (гр. В); ВР - 4 – 25% етиленгліколю + 25% пропандіолу (гр. Г); ВР - 5 – 25% гліцерину + 25% пропандіолу (гр. Д). Група К, в якій ооцит-кумулюсні комплекси корів не заморожували, була контрольною.

Всі вітрифікаційні розчини були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20% фетальної сироватки корів. Після розморожування гамет корів виведення кріопротекторів з них проводили шляхом перенесення їх на 10 хвилин у розчин 1,0 М сахарози. Потім клітини тричі відмивали середовищем 199, оцінювали за морфологічними ознаками і переносили в середовище для культивування. ОКК корів культивували протягом 27 годин при температурі 38,5°C, 5% CO₂ у повітрі, в краплях середовища 199 з 10% попередньо інактивованою сироваткою корів, 2,5 мкг/мл ФСГ, 1,0 мкг/мл естрадіолу, 2,5 М Од/мл лютеїнізуючого гормону, 2,0 мМ натрія пірувату, 2,92 мМ кальція лактату, 40 мкг/мл гентаміцину. Після культивування поза організмом здійснювали цитогенетичний аналіз гамети корів. Цитогенетичні препарати готували за методом Tarowski A.K., забарвлювали 10% розчином Гімза та досліджували під мікроскопом.

Результати і їх обговорення

В Інституті розведення і генетики тварин УААН функціонує Банк генетичних ресурсів тварин в якому накопичено 132 тис. спермодоз еякульованих сперматозоїдів 25 порід великої рогатої худоби. На зберігання в банк закладено 1100 спермодоз бугаїв та 3800 спермодоз кнурів епідидимальних сперматозоїдів. Даний матеріал використовується не лише для зберігання, а і для наукових досліджень з відпрацювання, удосконалення ефективності формування ембріонів *in vitro* та розробки, на основі цього методу, новітніх біотехнологічних напрямків. Такі дослідження вимагають наявності великої кількості вихідного біологічного матеріалу для експериментів. Також в банк генетичних ресурсів нами закладено епідидимальні сперматозоїди від бугаїв та кнурів, яких використовували як плідників (табл.).

Таблиця

Наявність кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів у Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин УААН

Вид тварин	Кличка, № плідника/порода	Господарство, якому належав плідник	Заморожено доз	Рухливість розморожених сперматозоїдів, бали
Бугаї	Океан 2163/ голштинська	ДСП „Головний селекційний центр України”	60	5
	Араб 1985/ голштинська	ДСП „Головний селекційний центр України”	100	5
Кнури	Бистрий 523 / синтетична популяція Дніпропетровського аграрного університету	ПЗ „Самарський”	450	3
	00360/велика біла	ВАТ „Агрокомбінат „Калита”	150	3

Відомо, що епідидимальні сперматозоїди баранів, кнурів і бугаїв проявляють вищий рівень стійкості до холодового шоку порівняно з еякульованими [6]. Нами відмічено, що рухливість свіжоодржаних епідидимальних сперматозоїдів залежно від виду складає від 3 до 8 балів, а після розморожування від 3 до 5 балів. Такий прояв рухливості епідидимальних сперматозоїдів самців є стабільним, що свідчить про ефективність даного методу для збереження генофонду тварин.

Застосування кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів кнурів для осіменіння яйцеклітини поза організмом дозволило встановити запліднювальну здатність кнура Бистрий 523 на рівні 45,7% за результатами формування зигот *in vitro* (37/81). При аналізі ефективності використання заморожено-розморожених епідидимальних сперматозоїдів цього кнура встановлений рівень дроблення ембріонів свиней поза організмом (35,8%) та розвитку *in vitro* сформованих ембріонів до доімплантаційних стадій (23,5%). Ці дані узгоджуються з результатами досліджень Х. Ікеди із співавторами, якими відмічено 60%-й рівень запліднення *in vitro* яйцеклітин свиней та ефективність дроблення зародків на рівні 21% при використанні кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів кнурів [7]. Заплідненість гамет самок поза організмом у наших дослідженнях була нижчою, але підібрані нами умови культивування ембріонів свиней *in vitro* забезпечили вищий рівень дроблення ембріонів.

Результати застосування кріоконсервованих епідидимальних сперматозоїдів свідчать про можливість їх використання для сучасних біотехнологічних методів і стосовно цього виду тварин про відсутність альтернативного джерела гамет кнурів для співкультивування з яйцеклітинами поза організмом у будь-який час.

Дослідження з поєднання ендо- і екзоцелюлярних кріопротекторів у вітрифікаційному розчині при заморожуванні ооцит-кумуляусних комплексів корів. Після розморожування гамет корів і їх оцінки за морфологічними ознаками переважна більшість з них виявились придатними для подальших маніпуляцій, зокрема культивування (гр. А – 93,3%; гр. Б – 88,9%; гр. В – 92,2%; гр. Г – 90,0%; гр. Д – 95,6%). За результатами цитогенетичного аналізу деконсервованих і прокультивованих поза організмом 27-м годин гамет корів виявлено різний рівень досягнення клітин стадії метафази-2 мейозу. Так 64,3 та 55,0% клітин знаходяться на метафазі-2 мейозу відповідно в групах А і Б, в яких для їх заморожування використовували поєднання проникаючих і непроникаючих кріопротекторів. При використанні для заморожування гамет тільки проникаючих кріопротекторів стадії метафази-2 мейозу після 27-ми годин культивування досягали 48,2; 56,8 і 54,7% гамет відповідно у групах В; Г і Д. Показник клітин з хромосомними порушеннями становив 22,6 і 28,8% відповідно у групах А і Б та 37,3; 30,9 і 26,7% у групах В; Г і Д. В контрольній групі, в якій використовували нативні гамети, через аналогічний термін культивування дозрівали до метафази-2 мейозу 81,2% клітин, а 10,6% при цьому мали порушення хромосом.

Висновки

Застосування методу кріоконсервування епідидимальних сперматозоїдів можна використовувати для удосконалення сучасних біотехнологічних розробок, збереження генофонду видатних особин та отримання потомства.

Застосування для кріоконсервування гамет корів вітрифікаційного розчину, який складається з 40% етиленгліколю, 0,5М сахарози і 18% фіколу збільшує показник дозрівання поза організмом деконсервованих ооцитів корів до метафази-2 мейозу на 7,5 - 16,1%, та зменшує кількість клітин з хромосомними порушеннями на 4,1 – 14,7%.

Створення генетичних банків є важливою ланкою у збереженні зникаючих генетично цінних тварин від яких життєво неможливо одержати біологічний матеріал унікальних генотипів.

Література

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. Сохранение генетических и уникальных видов животных / В.А. Багиров, Л.К. Эрнст, П.М. Кленовицкий, Н.А. Зиновьева //Цитология. - 2004.-Т. 46.- № 9, .-С.767-768.
3. Improving cryopreservation systems / G. Vajta, M. Kuwayama // Theriogenology.- 2006.- Vol.65, I.1.- P.236-244.
4. Криоконсервация половых клеток и эмбрионов животных: Монография / Л.В.Горбунов, Л.П. Бучацкий - К.: Издательско-полиграфический центр "Киевский университет", 2005.- 325 с.: ил., табл.- Библиогр.: с. 317-322.
5. Вплив різних кріопротекторів та їх сумішей на морфокінетичні характеристики сперміїв людини / В.І. Грищенко, Н.Н. Чуб, В.Л. Родіонова та ін. // Науково-технічний бюлетень: Зб. наук. праць.- Харків, 2008.- № 96.- С. 130-137.
6. The relationship of swimming movements of epididymal spermatozoa to their fertilizing capacity / R.J. Blandau, R.E. Rumery // Fertil. Steril.- 1964. № 15.- P 571-579.
7. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm / Н. К. Ikeda, J. Kikuchi, Н. Noguchi et al. //Theriogenology.- 2002.-V.57.-P. 1309-1318.

Резюме

Обсуждается эффективность использования эпидидимальных сперматозоидов быков и хряков для сохранения генофонда и использования в биотехнологических исследованиях. Установлена эффективность применения эндо- и экзоцеллюлярных криопротекторов в витрификационном растворе для замораживания ооцит-кумулюсных комплексов коров.

It is discussed effects of using bull and board epididymal spermatozoa in preservation of gene poll and biotechnology investigation. It is investigated efficiency of application intracellular and outside cellular crioprotectors in vitrification solution for bovine oocytecumulus complexes freezing.

ЭЛЬКОНИН Л.А., КОЖЕМЯКИН В.В., ЦВЕТОВА М.И.

*ГНУ НИИ сельского хозяйства Юго-Востока Россельхозакадемии,
Россия, 410010, Саратов, ул. Тулайкова, 7, e-mail: elkonin@mail.saratov.ru*

НАСЛЕДУЕМАЯ АКТИВАЦИЯ ГЕНОВ-ВОССТАНОВИТЕЛЕЙ УСЛОВИЯМИ ВЫРАЩИВАНИЯ РАСТЕНИЙ КАК МЕХАНИЗМ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ФЕРТИЛЬНОСТИ В ЦМС-ИНДУЦИРУЮЩЕЙ ЦИТОПЛАЗМЕ ТИПА «9Е» У СОРГО

Наследуемые изменения генной активности, возникающие в онтогенезе растений и происходящие без изменений последовательности ДНК, относятся к числу наиболее интригующих явлений генетики, составляя сферу эпигенетики растений [1]. Известно, что подобные эпигенетические явления весьма чувствительны к условиям внешней среды и возникают как ответ на действие конкретных факторов. Так, у кукурузы температура или длина фотопериода влияют на индукцию парамутаций в генах, контролирующих окраску зерновки [2]. К сожалению, подобные эффекты для многих генетических систем растений изучены чрезвычайно слабо, в том числе, и для систем, контролирующую цитоплазматическую мужскую стерильность (ЦМС).

Нами в течение ряда лет проводилось исследование линий сорго с ЦМС типа «9Е» и генетически близкими к нему типами А4 и «М35-1А» [3,4]. В результате этих исследований было выявлено крайне необычное явление. Ген-восстановитель,