

УДК 636.4.082.4:575.22

**Остаповець Л.І.**, к.б.н., (ostlara@online.ua) ©**Стародуб Л.Ф.**, к.с.-г.н. (starodublf@yandex.ua)Інститут розведення і генетики тварин,  
с. Чубинське, Бориспільський район, Київська обл.

### ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ОЦІНКИ РЕПРОДУКТИВНОГО ПОТЕНЦІАЛУ КНУРІВ

У статті представлені дані щодо дослідження запліднювальної здатності сперматозоїдів кнурів великої білої породи на основі моделювання процесу взаємодії гамет в умовах *in vitro* та цитогенетичної оцінки хромосомного поліморфізму соматичних клітин плідників

**Ключові слова:** ооцит, сперматозоїд, *in vitro*, запліднення, ембріон, каріотип, хромосомні аберації, велика біла порода свиней

**Вступ.** Інтенсифікація галузі тваринництва значно залежить від правильної системи формування стада, інтенсивності використання маточного поголів'я та плідників. Контроль і оцінка відтворювальних якостей кнурів загальноприйнятими методами за якістю потомства не дає повних даних про морфофункціональний стан організму, ступінь впливу нестабільності каріотипу на відтворювальну здатність плідників, формування величини багатоплідності у спарованих ними свиноматок, виходу поросят. Загальноприйняті методи оцінки ускладнюються ще й тим, що ряд успадкованих хромосомних аномалій фенотипово проявляються лише у дорослих нащадків, одержаних від тварин із генетичними дефектами [2]. Тому для повної характеристики репродуктивного потенціалу плідника доцільно проводити генетико-біотехнологічний моніторинг, складовою частиною якого є аналіз каріотипу тварини та перевірка запліднювальної здатності сперматозоїдів за допомогою методу запліднення яйцеклітин *in vitro*.

Проведення попереджувальної діагностики генетичного потенціалу кнурів комерційних порід із застосуванням цитогенетичних методів дає можливість оцінити мутабільність факторів зовнішнього середовища, визначити ступінь впливу хромосомних аномалій на продуктивні та репродуктивні властивості тварин, їх життєздатність, вірогідність генетичного ризику на основі обліку частоти і спектру хромосомних мутацій у соматичних клітинах. Поєднання генетичної оцінки каріотипу плідників із методом отримання ембріонів *in vitro* у системі репродукції сільськогосподарських тварин підвищує ефективність відбору плідників за запліднювальною здатністю сперматозоїдів. Згідно з «Інструкцією із штучного осіменіння свиней» запліднювальну здатність сперми кнура слід перевіряти не менше ніж за п'ятьма еякулятами і осіменінням двадцяти свиноматок [7], що пов'язано з великими витратами коштів і часу. Моделювання процесів взаємодії жіночих та чоловічих гамет в умовах *in vitro* дозволяє швидко, об'єктивно, з меншими

витратами оцінити запліднювальну здатність сперматозоїдів плідників порівняно з застосуванням штучного осіменіння [1, 8]. Так, в одному досліді можна осіменити до 100 дозрілих *in vitro* ооцитів сперматозоїдами від одного кнура та через 3–6 днів мати результати запліднювальної здатності сперматозоїдів.

Метою нашої роботи була оцінка відтворювальних якостей кнурів великої білої породи використовуючи цитогенетичні та біотехнологічні методи.

**Матеріал і методи.** Об'єктом досліджень були три кнури віком 2 роки великої білої породи, які утримувались у типових умовах СВАТ «Агрокомбінат «Калита» Київської обл.

Методика одержання цитогенетичних препаратів із лімфоцитів периферійної крові передбачала таку послідовність етапів: взяття крові, її транспортування, підготовку стерильних флаконів із живильним середовищем, приготування препаратів, забарвлення, аналіз метафазних пластинок, фотографування [6]. У процесі досліджень визначали відсоток метафазних пластинок із кількісними порушеннями (анеуплоїдія), клітини із асинхронністю розщеплення центромірних районів хромосом (АРЦРХ) та структурними порушеннями – розривами хромосом. У кожній тварини аналізували 100 метафазних пластинок.

Мікроядерне тестування проводили на цих самих препаратах, підраховуючи двоядерні лімфоцити (ДЯ), одноядерні лімфоцити з мікроядрами (МЯ), мітотичний індекс (МІ).

Ооцит-кумулюсні комплекси одержували із яєчників забитих свиней великої білої породи. Ооцити дозрівали *in vitro* в середовищі ТС 199 з додаванням 20% еструсної сироватки крові корів і  $3\text{--}5 \times 10^6$  клітин гранульози/мл (клітини гранульози одержували із фолікулів діаметром 3–4 мм без атретичних змін та з морфологічно нормальним ооцитом). Культивували ооцит-кумулюсні комплекси свиней протягом 45 годин при  $+38,8^\circ\text{C}$  і 4%  $\text{CO}_2$  у повітрі. Для запліднення *in vitro* використовували еякульовані сперматозоїди кнурів великої білої породи Рухливі сперматозоїди відбирали методом спливання (swim-up) в середовищі TALP без іонів кальцію [9]. Спільну інкубацію дозрілих *in vitro* ооцитів та відібраних методом swim-up сперматозоїдів проводили протягом 20 годин у модифікованому середовищі Тіроде (TALP) з додаванням 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  гепарину, 20  $\mu\text{M}$  пеніциламіну, 10  $\mu\text{M}$  гіпотаурину та 1  $\mu\text{M}$  епінефрину. Відмиті від сперматозоїдів передбачувані зиготи культивували *in vitro* в середовищі NCSU-23. Цитогенетичні препарати ооцитів та ядер ембріонів готували за модифікованим нами методом А.К. Тарковського [10]. Препарати фарбували з використанням 2%-го розчину барвника Гімза і аналізували їх під світловим мікроскопом при збільшенні ок.10 $\times$ , об.100.

Вивчення продуктивності кнура за відтворювальною здатністю запліднених свиноматок, показники спермопродуктивності проводили за матеріалами зоотехнічного обліку.

Статистичну обробку отриманих даних здійснювали стандартними методами [5] із використанням комп'ютерної програми «Microsoft Excel».

**Результати дослідження.** Кількість і якість приплоду значною мірою залежить від племінних якостей кнурів-плідників, які використовуються для

парування або одержання сперми для штучного осіменіння. Тому кнур повинен бути клінічно здоровим, енергійним у статевому відношенні, мати заводську вгодованість, одержувати повноцінний раціон і користуватися активним моціоном.

За результатами перевірки запліднювальної здатності сперматозоїдів кнурів Раял Турк 801, Наполеон 835, Денні 845 в умовах *in vitro* встановлена відсутність вірогідної різниці між запліднювальною здатністю гамет кнурів після осіменіння дозрілих *in vitro* ооцитів і даними штучного осіменіння свиноматок (табл. 1). За результатами морфологічного аналізу встановлено, що рівень формування ембріонів свиней із використанням для осіменіння дозрілих *in vitro* ооцитів еякульованих гамет кнура Наполеон 835 був найвищим і становив 66,7% (рис. 1).

Таблиця 1

## Запліднювальна здатність сперматозоїдів кнурів

| Кличка,<br>№ кнура | Штучне осіменіння                 |   | Запліднення <i>in vitro</i> |                                  |
|--------------------|-----------------------------------|---|-----------------------------|----------------------------------|
|                    | осіменено<br>свиноматок,<br>голів | опоросилось спарованих<br>свиноматок, голів (%) | осіменено<br>ооцитів,<br>п  | кількість<br>ембріонів,<br>п (%) |
| Раял Турк 801      | 11                                | 6 <sup>a*</sup> (54,5)                          | 62                          | 32 <sup>a</sup> (51,6)           |
| Наполеон 835       | 70                                | 51 <sup>b</sup> (72,8)                          | 60                          | 40 <sup>b</sup> (66,7)           |
| Денні 845          | 128                               | 74 <sup>c</sup> (57,8)                          | 58                          | 34 <sup>c</sup> (58,6)           |

\*- показники порівнюються в межах одного рядка

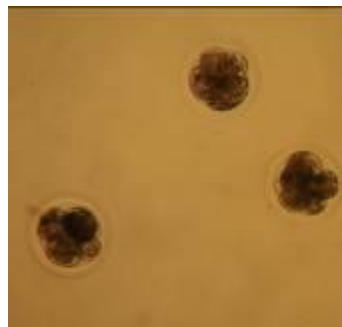


Рис. 1. Сформовані *in vitro* ембріони свиней на різних стадіях розвитку, об. 10х, ок.10х

Репродуктивний потенціал кнурів визначається кількістю отриманого від них приплоду, який залежить від якості отриманої сперми та запліднювальної здатності сперматозоїдів (табл. 2).

Незважаючи на високу стабільність каріотипу, зміни хромосомного апарату у свиней відбуваються у частині клітин, практично у кожній тварини, внаслідок мутаційного впливу, а також природного та штучного добору. Цитогенетичний контроль у племінній роботі дає можливість оцінити мутабільність факторів зовнішнього середовища, визначити асоційований зв'язок хромосомних аномалій із продуктивними і репродуктивними властивостями тварин, їх життєздатністю.

Таблиця 2

## Оцінка кнурів за їх відтворною здатністю та продуктивністю

| Показники                                     | Одинці виміру | Раял Турк 801 | Наполеон 835 | Денні 845  |
|---|---------------|---------------|--------------|------------|
| Вік   | міс           | 24            | 24           | 24         |
| Об'єм еякуляту                                | мл            | 384,2±37,86   | 189,0±8,63   | 225,±4,78  |
| Концентрація сперматозоїдів                   | млрд/мл       | 0,20±0,01     | 0,27±0,01    | 0,26±0,01  |
| Рухливість сперматозоїдів                     | бали          | 8             | 8            | 8          |
| Запліднюваність                               | %             | 54,5          | 72,8         | 57,8       |
| Багатоплідність                               | гол.          | 12,6±1,02     | 11,1±0,31    | 11,0±0,18  |
| Потомство без паталогій                       | %             | 93,6          | 91,2         | 91,9       |
| Середня маса гнізда при відлученні в 2 місяці | кг            | 182,5±10,08   | 188,9±5,46   | 192,0±3,86 |

У каріотипі кнурів, яких досліджували, виявлено спектр спонтанних хромосомних мутацій геномного і структурного типу (табл. 3) Геномні порушення хромосом виражені у вигляді анеуплоїдних клітин, частота яких становила 25-27 %, перевищуючи показники даної мінливості, одержані іншими вченими [4] із статистично невірогідною різницею середніх величин (рис. 2). Клітини із асинхронним розходженням центромірних районів хромосом із частотою 5,2-30 %, які відображають передумови виникнення числових порушень, вказують на індивідуальні відмінності кнурів.

Таблиця 3

## Хромосомний поліморфізм кнурів, %

| Плідник       | Анеуплоїдія | АРЦРХ | Розриви хромосом | МЯ | ДЯ | МІ |
|---------------|-------------|-------|------------------|----|----|----|
| Денні 845     | 27          | 9     | -                | 1  | 2  | 7  |
| Наполеон 835  | 25          | 30    | 6                | 2  | 5  | 6  |
| Раял Турк 801 | 26          | 5,2   | -                | 2  | 1  | 10 |

Рис. 2. Анеуплоїдія  $2n=41$ , об. 10х, ок.10х

Розриви хромосом із частотою  $0,0 = 6,0$  % свідчать про порушення їх структури, проте не перевищують рівня, характерного для свиней даної породи. Для більш повної оцінки соматичного мутагенезу, який проявився у кнурів, використовували мікроядерний тест. Результати досліджень показали, що

середні значення мікроядерного тесту у досліджених плідників не перевищували спонтанний рівень, який відповідає 10% [3], тобто тварини не зазнавали прямого токсичного екзогенного впливу.

Для встановлення асоційованого зв'язку між нестабільністю каріотипу та відтворною здатністю і продуктивністю кнурів провели кореляційний аналіз (табл. 4).

Таблиця 4

**Кореляційний зв'язок між нестабільністю каріотипу та продуктивністю і відтворною здатністю кнурів**

| Корелюючі ознаки               | Хромосомні порушення |         |                  |
|--------------------------------|----------------------|---------|------------------|
|                                | Анеуплоїдія          | АРЦРХ   | Розриви хромосом |
| Об'єм еякуляту                 | 0,6424               | -0,7400 | -0,6425          |
| Концентрація сперматозоїдів    | -0,1321              | 0,7165  | 0,6100           |
| Запліднювальна здатність       | -0,7690              | 0,9996  | 0,9556           |
| Багатоплідність                | -0,0558              | -0,5733 | -0,5475          |
| Потомство без паталогій        | 0,2836               | -0,8156 | -0,7251          |
| Середня маса гнізда у 2 місяці | 0,3100               | 0,3341  | 0,1966           |

Отримані результати показали значні від'ємні кореляційні зв'язки між асинхронним розходженням центромірних районів хромосом та розривами хромосом і об'ємом еякуляту, багатоплідністю та народжуванням потомства із патологією. Проте зв'язки між ознаками, які вивчаються, статистично недостовірні. Це означає, що із підвищенням частоти клітин із АРЦРХ, розривами хромосом спостерігається у плідників тенденція до зменшення об'єму еякуляту, зниження багатоплідності та підвищення народження потомства із патологією.

Аналізуючи показники відтворної здатності та продуктивності з хромосомною мінливістю у кнура Наполеона 835, встановили, що для нього характерний найвищий рівень запліднювальної здатності (72,8%) та частота клітин із АРЦРХ (30 %) порівняно з іншими тваринами, яких досліджували. Структурні порушення у вигляді розривів хромосом були теж характерні лише для цієї тварини. За результатами продуктивності кнура за відтворювальною здатністю запліднених свиноматок встановили, що найбільша кількість нежиттєздатних поросят була одержана саме від кнура Наполеона 835. Це дає змогу припускати, що підвищений рівень клітин із АРЦРХ та наявність хромосомних розривів може бути причиною появи потомства зі зниженою життєздатністю.

**Висновки.** Отже, впровадження у практику тваринництва комплексного підходу, який ґрунтується на проведенні попереджувальної цитогенетичної діагностики плідників комерційних порід та перевірки запліднювальної здатності сперматозоїдів за допомогою методу запліднення яйцеклітин *in vitro*, дасть можливість у короткий термін провести об'єктивну оцінку репродуктивного потенціалу тварин.

**Література**

1. Буркат В. П. Биотехнологические методы оценки и прогнозирования оплодотворяющей способности сперматозоидов быков / В. П. Буркат, В. Е. Кузнецов, И. Б. Елизарова // Вісник аграрної науки. – 1992. – № 11. – С. 22–26.
2. Гусев Д. И. Оценка воспроизводительных качеств свиней в зависимости от уровня кариотипической изменчивости : автореф. дис. на соискание степени канд. биол. наук : спец. 06.02.01 – разведение, селекция, генетика и воспроизводство сельскохозяйственных животных / Д. И. Гусев. – М., 2009. – 21 с.
3. Ильинских Н. Н. Цитогенетический гомеостаз и иммунитет / Ильинских Н. Н., Ильинских И. Н., Бочаров Б. Ф. – Новосибирск : Наука, 1984. – 256 с.
4. Кобидзе И. Г. Цитогенетическое обследование племенных хрячков пород крупная белая и ландрас / И. Г. Кобидзе // Вопросы производства свиней. Бюллетень научных работ ВИЖа. – 1989. – Вып. 93. – С. 56–58.
5. Меркурьева Е. К. Генетика с основами биометрии / Е. К. Меркурьева, Г. Н. Шангин-Березовский. – М. : Колос. – 1983. – 400 с.
6. Шельов А. В. Методика приготування метафазних хромосом лімфоцитів периферійної крові тварин / А. В. Шельов, В. .В. Дзіцюк // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві. – К., Аграрна наука. – 2005. – С. 210–213.
7. Інструкція із штучного осіменіння свиней / відп. за вип. Ю. Ф. Мельник. – К. : Аграрна наука, 2003. – 56 с.
8. Ковтун С. І. Одержання зародків свиней *in vitro*: стан та перспективи використання / С. І. Ковтун // Вісник аграрної науки. – 2004. – № 5. – С. 52–54.
9. Katska L. Instrukcja wdrozeniowa nr 2/93. Produkcja zarodkow bydlecych metodami *in vitro* / L. Katska, Z. Smorag, B. Rynska. – Krakow, 1993. – 18 s.
10. Tarkowski A. K. An air-drying method for chromosome preparation from mouse eggs / A. K. Tarkowski // Cytogenetics. – 1966. – Vol. 5, № 3. – P. 394–400.

**Summary****Ostapovetz L.I., Starodub L.F.****CYTOGENETIC AND BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF BOAR ASSESSMENT REPRODUCTIVE POTENTIAL**

*Data fertilization ability Large White boar sperm at the base of gamete interaction process modeling under in vitro conditions and cytogenetic assessment of chromosomal polymorphism of sire somatic cells are represented in the article*

Рецензент – д.с.-г.н., професор Півторак Я.І.