

Summary

DNA-technologies in the selection work with Farm Animals

I.P. Sheiko, T.I. Yepishko, R.I. Sheiko, O.P. Kurak .

Ways of researching DNA-technologies by PRC-RFLP method have been formed. Their further improvement in breeding programmes are described.

Key words: PRC-RFLP method, RYR1, ESR, PRLN, H-FABP, CSN3, BLAD, reliable appearance estimation.

УДК 636.2.034:612.02

ПОДГОТОВКА СПЕРМАТОЗОИДОВ БЫКОВ К ОПЛОДОТВОРЕНИЮ ЯЙЦЕКЛЕТОК IN VITRO

Ганджа А.И., Леткевич Л.Л., Симоненко В.П., Голубец Л.В.¹

РУП «Институт животноводства НАН Беларуси»,

¹УО «Гродненский государственный аграрный университет»

Важнейшим ресурсом повышения эффективности производства сельскохозяйственной продукции, в том числе продуктов животноводства, являются технологии, основанные на последних достижениях сельскохозяйственной и биологической науки. В этом плане особые надежды связаны с развитием биотехнологий, основанных на культивировании *in vitro* эмбрионов с их последующей трансплантацией животным-риципиентам для продукции потомства. Этот подход направлен на максимальное использование потенциала отдельных, наиболее высокопродуктивных доноров яйцеклеток для генетического улучшения продуктивности популяций сельскохозяйственных животных [2].

Известно, что для успешного оплодотворения ооцитов, сперматозоиды млекопитающих проходят процесс созревания или капацитации. В естественных условиях это происходит в половых путях самок и заключается в изменении характера плавательной активности и преобразовании строения клеточных мембран на головке спермиев. Эти преобразования состоят в удалении поверхностной оболочки спермиев, а также в обеспечении исходно неподвижных половых клеток необходимыми веществами для придания им плавательной активности. Окончательной стадией преобразования спермиев (фаза капацитации) при постановке опытов *in vitro* можно считать приобретение ими оплодотворяющей способности [1].

Цель исследований.

Целью наших исследований явилась разработка метода подготовки спермиев быков к оплодотворению в условиях *in vitro*.

Материалы и методика исследований.

Исследования были проведены в лаборатории генетики РУП «Институт животноводства НАН Беларуси». Созревание ооцитов проводили

по разработанной ранее нами методике из яичников убитых на мясокомбинате коров путем культивирования их вне организма.

Для оплодотворения ооцитов использовали замороженно-оттаянную сперму, которую помещали в пробирку с 1 мл питательной среды и ставили в термостат на 1 час. В качестве питательных сред для капацитации использовали разработанные нами питательные среды на основе ТС-199 и Тироде. Надосадочную жидкость отсасывали, помещали в другую пробирку и центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Затем верхний слой жидкости сливали, осадок дважды отмывали средой для капацитации методом центрифугирования при 3000 об/мин, причем при втором отмывании в среду добавлялся гепарин в различных концентрациях и проводилась swim-up процедура. Затем сперма отмывалась трижды в среде для оплодотворения и в количестве 1×10^6 сперматозоидов в 1 мл добавлялась к ооцитам, находящимся к этому времени в среде для оплодотворения. Совместная инкубация спермы и ооцитов продолжалась 18-20 часов при температуре 38°C в атмосфере 5% CO_2 и максимальной влажности. Эффективность капацитации определяли по уровню дробления и выходу жизнеспособных зародышей.

Все манипуляции с яйцеклетками, оценку активности сперматозоидов, стадий развития и качества ранних эмбрионов крупного рогатого скота осуществляли под микроскопом МБС-10 при увеличении в 100 крат.

Результаты исследований.

Для получения качественных эмбрионов вне организма необходимо соблюдать два неперемняемых условия: ооциты должны достичь стадии созревания (метафаза 2), а сперматозоиды пройти процесс капацитации. В естественных условиях сперматозоиды проходят подготовку к оплодотворению в половых путях самки. Её сущность заключается в структурных и ферментативных изменениях акросомы сперматозоида, после которых он становится способным к пенетрации ооцита.

В качестве капацитирующего агента мы использовали гепарин в количестве 50, 100, 150, 200, 250 ед/мл, а базовой среды – среду ТС – 199. После добавления гепарина сперматозоиды проходят ряд этапов, характеризующих их способность проникать внутрь яйцеклетки: после добавления гепарина от прямолинейно-поступательного движения они переходят к «гиперактивному» и затем снова к прямолинейно-поступательному. Кроме того, отдельные сперматозоиды после завершения капацитации начинают агрегировать между собой.

По результатам исследования установлено (таблица 1), что продолжительность гиперактивного движения существенно различались в зависимости от концентрации гепарина. При добавлении в среду 50 ед/мл гепарина сперматозоидов с гиперактивным движением, а также агрегиро-

ванных спермиев не обнаружено. С увеличением концентрации препарата от 100 до 250 ед/мл доля спермиев с гиперактивным движением увеличилась с 15 до 80%, а его продолжительность – от 30 до 135 минут. Аналогичная зависимость наблюдалась и по уровню агрегации сперматозоидов – 5,7–57,0%, соответственно.

Таблица 1
Эффективность применения гепарина в качестве
капацитирующего агента

Концентрация гепарина, ед/мл	Продолжительность гиперактивного движения, мин	Доля спермиев с гиперактивным движением, %	Доля агрегированных спермиев, %
50	–	–	–
100	30	15	5,7
150	30	28	27,5
200	100	75	45,0
250	135	80	57,0

Эффективность капацитации спермиев определяли, как уже говорилось выше, по уровню дробления и выходу полноценных зародышей. Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2
Оплодотворяющая способность спермы в зависимости от
концентрации гепарина в качестве капацитирующего агента

Концентрация гепарина, ед/мл	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-ВІ, n-%
50	70	8–11,4	–
100	150	74–49,3	35–23,3
150	150	85–56,7	29–19,3
200	100	34–34,0	12–12,0
250	90	3–3,3	9–10,0

Анализ данных таблицы показывает, что лучшие результаты по уровню дробления и выходу эмбрионов на стадии морула-бластоциста получены при применении гепарина в концентрации 100 и 150 ед/мл – 49,3–56,7 и 23,3–19,3%, соответственно. При увеличении концентрации гепарина до 200–250 ед/мл эти показатели снижались и составили соответственно 34,0–3,3 и 12,0–10,0%.

В процессе проведения опыта было отмечено, что чем выше концентрация гепарина, тем выше двигательная активность сперматозоидов и уровень их агрегации, достигавший 45–57%. В то же время, более высокий выход полноценных зародышей на стадии морулы-бластоцисты был отмечен при концентрации гепарина в среде для капацитации 100–150 ед/мл при уровне агрегации 5,7–27,5%.

Вне организма капацитацию сперматозоидов проводят искусственно в различных синтетических средах. В наших исследованиях мы использовали в качестве питательных сред ТС-199, Тироде и Тироде М (модифицированную). Эффективность их применения определяли по уровню дробления и выходу эмбрионов на стадии морула-бластоциста (табл. 3).

Таблица 3
Эффективность применения различных питательных сред для капацитации спермы

Питательная среда	Оплодотворено ооцитов, n	Уровень дробления, n-%	Выход Мо-ВІ, n-%
ТС-199	195	25-12,8	2-8,0
Тироде	195	52-26,7	9-17,3
Тироде М	195	48-24,6	12-25,0

Как показали исследования, наибольшей эффективностью обладала среда Тироде М. При ее применении уровень дробления составил 24,6%, а выход эмбрионов – 25%. Несмотря на то, что при применении среды Тироде уровень дробления был выше на 2,1%, выход морул - бластоцист снижался на 7,7%. Наименьшей эффективностью обладала среда ТС-199. Уровень дробления составлял 12,8, а выход эмбрионов на предимплантационных стадиях 8%.

Выводы.

Проведенные исследования позволили разработать метод подготовки сперматозоидов при использовании среды Тироде – М к оплодотворению ооцитов вне организма, позволяющий получать до 24,6% дробящихся зародышей, выход эмбрионов на предимплантационных стадиях при этом составил до 25% от числа дробящихся клеток.

Литература:

1. Голубец Л.В. Биологические аспекты репродукции животных // РУПП «Барановичская укрупненная типография», 2001 г. – 128.
2. Маленко Г.П. Получение ранних зародышей при созревании и оплодотворении ооцитов вне организма // Биологические основы высокой продуктивности сельскохозяйственных животных. Тез. докл. междунар. конф. – Боровск, 1980. – С. 127-128.

Резюме

В качестве капацитирующего агента спермиев быков использовали гепарин в концентрации 100 и 150 ед/мл, что позволило получить до 24,6% дробящихся клеток с выходом морул-бластоцист на уровне 25%.

Ключевые слова: капацитация, спермии, гепарин, оплодотворение.

Summary

Bulls sperm preparation to in vitro fertilization.

A.I. Gandja, L.L. Letkevich, V.P. Simonenko, L.V. Golubets

Heparin concentration of 100 and 150 units/ml when used as a capacitating sperm agent provided receiving of splitting cells by 24.6% with a level of morula-blastocystes yield by 25%.

Key words: capacitation, sperm, heparin, fertilization.

УДК 631.22:628.8:636.4

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЛОКАЛЬНОГО ОБОГРЕВА ПОРОСЯТ-СОСУНОВ В УСЛОВИЯХ ПРОМЫШЛЕННОГО КОМПЛЕКСА

**Безубов В.И., Соколова С.Н., Петрушко А.С.,
Перашвили И.И., Матюшонок Т.А.**

РУП «Институт животноводства НАН Беларуси»,
г Жодино, Республика Беларусь

Отрасль свиноводства выступает сегодня как мощный энергопотребитель. Существенную долю в используемой ею энергии составляют затраты, направленные на создание оптимальной температуры. Для разных половозрастных групп свиней она различна. Взрослым свиноматкам достаточно 15-16 °С тепла, для поросят-сосунов в первые дни жизни требуется 32-34 °С. Это связано с тем, что механизм терморегуляции у новорожденных животных еще недостаточно развит, а потребность в тепле значительна.

Вследствие слабого волосяного покрова и отсутствия подкожного жира у них теплоизоляция тела отсутствует. Через 30 минут после рождения температура тела поросенка снижается на 2-3° С. В дальнейшем при относительно низкой температуре в помещении (18-20°С) она может понижаться ещё на 3-4 °С и более и приближаться к критической. У новорожденных поросят она составляет 32-34 °С. При снижении окружающей температуры организм их подвергается охлаждению и даже переохлаждению, что может приводить к заболеваниям, снижению продуктивности и даже смерти. Механизм терморегуляции у поросят становится более совершенным лишь к 25-30-му дню после рождения, поэтому в период выращивания на подсосе температуру окружающего воздуха для поросят следует снижать постепенно, на 2° С каждую неделю, доводя ее к отъему до 22-24° С.

Наибольшую трудность представляет создание оптимальной температуры для матки и поросят в одном помещении, так как их потребности, как уже указывалось выше, сильно разнятся. При повышении температу-