

**КОВТУН С.І.<sup>1</sup>, МЕТЛИЦЬКА О.І.<sup>1</sup>, ЩЕРБАК О.В.<sup>1</sup>, ГИРЯ В.М.<sup>2</sup>, КОПИЛОВА К.В.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> Інститут розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця Національної академії аграрних наук України, Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1, e-mail: kovtun\_si@i.ua

<sup>2</sup> Інститут свинарства і агропромислового виробництва Національної академії аграрних наук України, Україна, 36013, м. Полтава, вул. Шведська Могила, 1, e-mail: pigbreeding@ukr.net

<sup>3</sup> Інститут продовольчих ресурсів Національної академії аграрних наук України, Україна, 02002, м. Київ, вул. Євгена Сверстюка (Марини Раскової), 4А, e-mail: kopylket@ukr.net

✉ kovtun\_si@i.ua, (044) 507-23-13, (095) 243-16-41, (097) 667-18-35

## **БІОТЕХНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ КРІОКОНСЕРВАЦІЇ СПЕРМИ КНУРІВ**

Активне використання у більшості європейських країн інтенсивних систем широкомасштабного селекційного вдосконалення існуючих порід свиней за допомогою відбору тварин із видатними показниками відгодівельних і м'ясних якостей за обмеженої кількості плідників сприяє розповсюдженню в стадах тварин із вадами екстер'єру і конституції, скороченню генетичної різноманітності популяцій та накопиченню в них «генетичного вантажу» у вигляді носіїв прихованих аутосомно-рецесивних мутацій.

Завдяки зниженню опірності тварин до інфекційних захворювань, виникають періодичні спалахи епізоотій, що призводять до загибелі найбільш видатних представників порід. З огляду на це, вітчизняні породи свиней представляють певний інтерес як резерв генетичного матеріалу, необхідного для подальшого розвитку світового тваринництва. Глобальна інтродукція обмеженої частини генофонду спеціалізованих порід із своїм генетичним тягарем та специфічним набором патогенів неминуче призведе до необхідності переорієнтації на генетичний резерв генофондів локальних порід з меншим рівнем продуктивності, проте більш адаптованих до місцевих умов утримання. Неконтрольоване завезення та інтенсивне використання репродуктивного матеріалу обмеженої кількості плідників зарубіжних комерційних порід поступово призводить до «генетичної ерозії» – зменшення генетичного різноманіття та скорочення чисельності локальних автохтонних порід, що реалізується через їх пряму заміну або поступовий процес поглинального схрещування. Аналіз ситуації, що склалася в Україні стосовно вітчизняних порід свиней, свідчить про наявність загрози повного зникнення для деяких із них уже найближчим часом.

Таким чином, вдосконалення існуючих технологій раціонального використання та ефективного застосування генетичного резерву автохтонних порід свиней шляхом тривалого збереження їх генофонду методом кріоконсервації генеративних клітин є актуальним і своєчасним завданням. Аналіз численних літературних даних дозволяє зробити висновок про існування низки ендегенних факторів, пов'язаних із видовими фізіологічними, біохімічними і молекулярно-генетичними особливостями сперми кнурів, а також екзогенних чинників впливу (технологічних і середовищних), що визначають низьку збереженість гамет цих тварин за кріоконсервації [1].

За результатами окремих досліджень, була показана наявність генетично детермінованої індивідуальної різниці певних плідників – представників різних ліній мишей – за показниками кращої стійкості гамет до наднизьких температур [2]. Відомо, що сперма бугаїв і птиці успішно підлягає процесу кріоконсервації за збереження високих показників активності та запліднюючої здатності після розморожування [3], тоді як генеративні клітини кнурів і баранів підлягають суттєвій руйнації за кріоконсервації, незважаючи на існуючі видоспецифічні комерційні протоколи заморожування [4]. Досягнення прогресу у розумінні причин таких відмінностей на генетичному рівні може слугувати основою для підвищення якості кріоконсервованої сперми шляхом застосування селекційних заходів відносно вибору та розведення плідників із бажаними ознаками, сприятиме пошуку нових методичних підходів щодо удосконалення протоколів кріоконсервації сперми кнурів.

Підвищення ефективності функціонування банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця

НААН шляхом впровадження удосконалених систем кріоконсервації сперматозоїдів кнурів може бути здійснене шляхом створення принципово нових методів прогнозування придатності генеративного матеріалу до тривалого збереження на основі використання інформації, отриманої за допомогою молекулярно-генетичного маркування.

Попередня оцінка якісних показників сперми кнурів, призначеної для довготривалого збереження, має важливе значення, оскільки від них залежить запліднююча здатність і багатоплідність закріплених за ними свиноматок, а отже, і доцільність закладення біологічного матеріалу до банку генетичних ресурсів. Останнім часом почали використовувати тонкі цитогенетичні тести для оцінки цілісності генетичного матеріалу сперматозоїдів та пов'язану із цим функціональність гамет під впливом кріогенних факторів [5, 6].

Кріоконсервацію та тривале зберігання гамет і ембріонів сільськогосподарських тварин необхідно розглядати як комплексний підхід до створення генофондового кріостада. Після розморожування гамет і повернення їх у фізіологічні умови життєздатність такого генетичного матеріалу повернеться, що в свою чергу забезпечить відновлення необхідного поголів'я тварин. За ініціативи академіка УААН В. П. Бурката розпочато комплектування на базі Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН банку генетичних ресурсів тварин для збереження і раціонального використання генофонду локальних, зникаючих та існуючих вітчизняних порід сільськогосподарських тварин. Підґрунтям для реалізації завдань збереження і раціонального використання генофонду зникаючих і локальних порід сільськогосподарських тварин є одержання, кріоконсервація та трансплантація ембріонів.

*Мета досліджень.* За використання інформативних біотехнологічних методів провести оцінку придатності сперми кнурів до кріоконсервації (терморезистентна проба, тест на термостресостійкість) та закласти таку сперму на зберігання в банк генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН.

### Матеріали і методи

У роботі використовували свіжоотриману сперму кнурів, відібрану одночасно від трьох кнурів миргородської породи, які утримуються

у державному підприємстві дослідне господарство «Надія» Інституту свинарства і АПВ НААН.

Еякуляти відбирали мануальним методом від плідників миргородської породи (№№1159, 79, 347) віком 2–2,5 роки за умов відсутності попередніх еякуляцій протягом тижня. Одразу після отримання сперму оцінювали за її основними якісними показниками та розріджували середовищем для транспортування, яке розроблено Інститутом свинарства і АПВ НААН. Тривалість транспортування еякулятів до лабораторії не перевищувала шести годин. Оцінена сперма кнурів відповідала вимогам «Інструкції із штучного осіменіння свиней» (2003).

Концентрацію сперматозоїдів в еякуляті визначали за допомогою лічильної камери Горяєва. Виживаність сперматозоїдів у годинах визначали за терморезистентною пробєю при  $t+38^{\circ}\text{C}$  упродовж трьох годин. Термостресостійкість визначали упродовж трьох годин з еквілібрацією температур від  $t+12^{\circ}\text{C}$  до  $t+38^{\circ}\text{C}$  упродовж кожних 30 хв згідно з методичними рекомендаціями [7]. Весь обсяг лабораторних досліджень проводився на базі Інституту розведення і генетики тварин імені М. В. Зубця НААН.

Для підготовки сперми до кріоконсервації її центрифугували при 3100 об/с (900 g) упродовж 5 хвилин для концентрації сперматозоїдів у невеликому об'ємі еякуляту. Одержану концентровану суміш сперматозоїдів розріджували ЛГЖ-середовищем та після 3-годинної еквілібрації при  $+4^{\circ}\text{C}$  заморожували у формі відкритих гранул.

### Результати та обговорення

Встановлено, що найменший об'єм еякуляту був відібраний від кнура № 79, найбільший у № 347 (табл.). Відмітимо, що у еякуляті останнього з досліджуваних кнурів, поряд з високим об'ємом сперми, спостерігалася найменша концентрація сперматозоїдів у еякуляті (3,0 %) за рівня їх активності 90 %. У кнура № 79, навпаки, було відмічено найвищий відсоток спермій у еякуляті, але у перерахунку на кількість їх значення було найменшим серед досліджених тварин і не перевищувало 31,5 млрд за дещо заниженого рівня їх активності (80 %).

Кращими показниками характеризувалася сперма кнура № 1159, а зафіксований в його еякуляті показник кількості сперматозоїдів був найвищим і склав 76,1 млрд. Отже, за основни-

ми морфологічними параметрами спермограма досліджених кнурів не виходила за межі визначених стандартів для свиней, усереднений рівень активності сперми дослідних кнурів сягав 87,5 %.

Для визначення придатності сперми кнурів до кріоконсервації і довготривалого збереження нами застосовано прискорений метод

визначення виживаності сперматозоїдів (терморезистентна проба) та тест на термостресстійкість [7]. За названими основними показниками придатності сперми кнурів до кріоконсервації (рис. 1) кращими показниками характеризувалася сперма кнура № 1159, для якого показники терморезистентної проби та термостресстійкості становили відповідно 40,0 % та 35,0 %.

Таблиця. Характеристика свіжоодержаної сперми кнурів

Індивідуальний №	Показники					
	Об'єм, мл	Порівняння із середнім показником, %	Об'єм сперматозоїдів в еякуляті, %	Загальна кількість сперматозоїдів в еякуляті, млрд	Активність сперматозоїдів, %	Порівняння із середнім показником, %
1159	260,0	86,7	4,2	76,1	90,0	103,8
79	240,0	80,0	5,0	31,5	80,0	92,3
347	400,0	133,3	3,0	36,4	90,0	103,8
Середній показник	300,0		4,06	48,0	86,7	

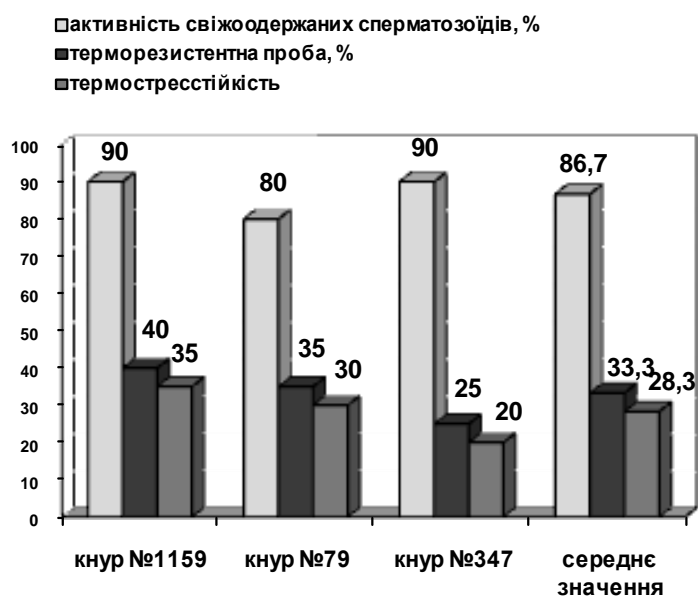


Рис. 1. Показники якості спермопродукції кнурів на придатність її до заморожування.

Термостресстійкість сперми кнура № 347 знаходилася на рівні 20,0 %, що дає підставу зробити висновок про знижену придатність сперматозоїдів цієї тварини для тривалого зберігання шляхом кріоконсервації. Причина такого явища може полягати у генетичних особли-

востях батька матері, яка одночасно є бабусею цієї тварини (Смородина № 884), та накопиченні генів, ймовірно, асоційованих із гіршими показниками стійкості сперми до дії наднизьких температур.

Наступний етап досліджень передбачав застосування технології кріоконсервації еякульованих сперматозоїдів кнурів із наступною перевіркою їх життєздатності після розморожування. Встановлено, що після розрідження сперми кнурів після центрифугування середовищем ЛГЖ та 3-годинної еквілібрації при +4°C їх активність знизилася в середньому на 5 %.

Слід зазначити, що від кожного кнура нами одержано по 250 гранул кріоконсервованої сперми. Розморожені сперматозоїди кнурів миргородської породи проявляли рухливість на рівні 13,33 %. За аналізу активності після розморожування встановлено, що цей показник знизився в середньому на 83,7 % (рис. 2).

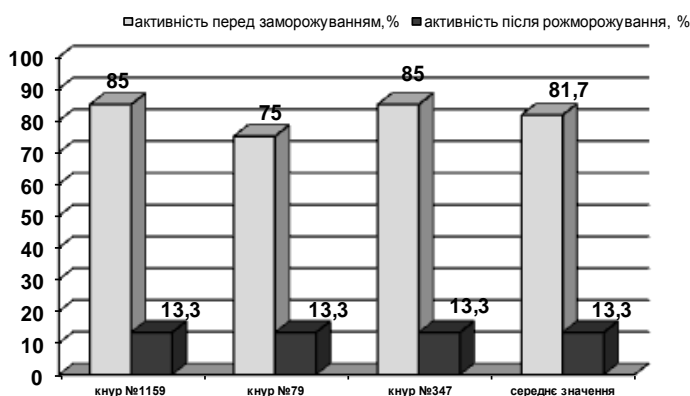


Рис. 2. Оцінка придатності еякульованої сперми кнурів до глибокого заморожування.

Нами відзначена індивідуальна особливість якості сперми кнурів миргородської породи, що впливає на її придатність до кріоконсервації. Найбільш придатною до кріоконсервації за показником термостресстійкості була сперма кнурів № 1159 та № 79, становила відповідно 35,0 % та 30 %. Після деконсервації показник активності сперматозоїдів в середньому знизився на 83,7 %.

За результатами аналізу племінних карток, всі кнури досліду були нащадками одного плідника лінії Ловчика 1205, який у попередніх наших дослідженнях характеризувався негативними показниками стійкості сперми до заморожування. Вплив породи-поліпшувача (п'єтрен) у кнурів помісного походження не сприяв покращенню показників стійкості їх сперми до наднизьких температур.

Відзначимо, що за результатами застосованих біотехнологічних методів до оцінки свіжоотриманої сперми кнурів гірша її придатність до заморожування може бути пов'язана із впливом генотипу кнурів породи п'єтрен, що виступали як порода-поліпшувач м'ясних якостей, але призвели до зниження показників стійкості сперми до наднизьких температур. Таким чином, недосконалість системи визначення критерію чистопородності тварин за даними їх

генеалогії потребує обов'язкової генетичної експертизи біологічного матеріалу за генетичними маркерами для визначення доцільності його тривалого збереження у банку генетичних ресурсів [8].

Оскільки в результаті проведеної роботи були отримані обнадійливі результати щодо можливості точного прогнозу придатності еякульованої сперми кнурів до кріоконсервації за використання сучасних комплексних методичних підходів, відзначимо перспективність проведення подальших досліджень із розробки та оптимізації відповідних методик, створення оптимальних видоспецифічних кріосередовищ для підвищення якісних показників розмороженої сперми кнурів зникаючих порід та доцільність продовження досліджень за цим напрямом.

## Висновки

1. Створено комплексний метод оцінки придатності сперми кнурів аборигенних порід до кріоконсервації із застосуванням морфологічних та біотехнологічних методів.

2. За морфометричними та функціональними показниками сперми потенційно кращими якостями придатності сперми до заморожування виявився чистопородний кнур миргородської

породи № 1159, для якого показники терморезистентної проби та термостресстійкості становили відповідно 40,0 % та 35,0 %.

3. Відзначена індивідуальна особливість якості сперми кнурів миргородської породи, що впливає на її придатність до кріоконсервації. За даними аналізу генеалогії, всі кнури досліджуваної породи були нащадками одного плідника лінії Ловчика 1205, який характеризувався негативними показниками стійкості сперми до заморожування (за даними власних досліджень). Вплив породи-поліпшувача (п'єтрен) у кнурів помісного походження не сприяв покращенню показників стійкості їх сперми до наднизьких температур.

4. Найбільш придатною до кріоконсервації за показником термостресстійкості була сперма кнурів № 1159 та № 79, вона становила відповідно 35,0 % та 30 %. Незважаючи на ці показники, показник активності сперматозоїдів після розморожування в середньому знизився на 83,7 %.

\* Робота виконана за фінансової підтримки Міністерства освіти та науки України в рамках проекту «Розроблення оптимізованої технології кріоконсервації генетичного матеріалу вітчизняних порід свиней» (договір № ДЗ/47-2015 від 30.10.2015 р.).

### Література

1. Наріжний А.Г., Крейндіна Н.И. Влияние способов обработки спермы перед замораживанием на показатели заморожено-оттаянной спермы // Зоотехния. – 2007. – № 7. – С. 31–32.
2. Tada N., Sato M. Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol // J. Reprod. Fertil. – 1990. – V. 89. – P. 511–516.
3. Ansh G.A., Buckland R.B. Genetic variation in fowl semen cholesterol and phospholipid levels and the relationship of these lipids with fertility of frozen-thawed and fresh semen // Poult. Sci. – 1982. – V. 61. – P. 623–637.
4. Pursel V.G., Johnson L.A. Frozen boar spermatozoa: methods of thawing pellets // J. Anim. Sci. – 1976. – V. 42. – P. 927–931.
5. Rusu V., Miclea V., Zahan M. A new model of boar semen evaluation and the impact of cryogenic factor on spermatic cells // Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii. – 2009. – V. 42, № 1. – p. 85–91.
6. Holt W.V., Van Look K.J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality // Reproduction. – 2005. – V. 127. – P. 527–535.
7. Квасницький О.В., Мартиненко Н.А., Коваленко В.Ф., Базалевич А.В. Спосіб прогнозування термостресстійкості спермів кнура. Патент України на корисну модель № 52538 від 25.08.2010. Бюл. № 16.
8. Метлицька О.І. Методологія ДНК – паспортизації генофондів сільськогосподарських тварин за гіперваріабельними локусами геному: дис. доктора с.-г. наук: 03.00.15. Чубинське. – 2012. – 382 с.

### KOVTUN S.I.<sup>1</sup>, METLITSKA O.I.<sup>1</sup>, SHCHERBAK O.V.<sup>1</sup>, GIRIA V.N.<sup>2</sup>, KOPYLOVA K.V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of Animal Breeding and Genetics n.d. a. M.V. Zubets of National Academy of Agrarian Science of Ukraine, Ukraine, 08321, Kyev Region, Borispol District, v. Chubinske, Pogrebnyaka str., 1, e-mail: kovtun\_si@i.ua

<sup>2</sup> Institute of Pig Breeding and Agro-Industrial Production National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 36013, Poltava, Shvedska Mogila str., 1, e-mail: pigbreeding@ukr.net

<sup>3</sup> Institute of food resources National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Ukraine, 02002, Kiev, Yevhen Sverstyuk (Marina Raskova) str., 4A, e-mail: kopylket@ukr.net

### BIOTECHNOLOGICAL METHODS SCORE EFFICACY THE CRYOPRESERVATION OF BOAR SEMEN

**Aim.** Estimate boar semen for suitability to cryopreservation using informative biotechnological methods (termoresistant probe, heat resistance test) to replenish genetic resources of Animal Gene bank Institute of Animal Breeding and Genetics n. M.V. Zubets, NAAS. **Methods.** In carrying out this work used biotechnology, cryobiological, morphological methods. **Results.** Mirgorod boars breed investigation we noted feature individual semen quality, which affect its suitability for cryopreservation. All boar genealogy analysis of experiment in Mirgorod breed descended from a line of boar named Lovchik 1205, which was characterized by negative performance stability to semen cryopreservation. For morphometric and functional parameters of sperm, potentially of better quality sperm for cryopreservation was boar Mirgorod purebred № 1159, for which termoresistant probe, heat resistance test indices was respectively 40.0 % and 35.0 %. Most suitable for cryopreservation in terms of heat resistance test boar semen was number 1159 and № 79, and amounted to 35.0 % and 30 %. Nevertheless, after thawing average sperm activity index fell to 83.7 %. **Conclusions.** Established a comprehensive method for assessing the suitability of native breeds boar semen cryopreservation involving of morphological and biotechnological methods

**Keywords:** cryobank, spermatozoa, cryopreservation, gene pool.