

А. Мухамедшина // Свиноводство. – 2006. – № 1. – С. 26-27.

4. Милованов, В. К. Биология воспроизведения и искусственного осеменения животных / В. К. Милованов. – М. : Сельхозгиз, 1962. – 695 с.

Поступила 17.03.2014 г.

УДК 636.2:612.64.089.67

А.И. БУДЕВИЧ, С.Н. ПАЙТЕРОВ, С.А. САПСАЛЕВ,
Ю.К. КИРИКОВИЧ, Т.Н. ЛУКАШЕВИЧ, И.В. МИХЕДОВА,
П.Е. САХОНЧИК, В.В. ЖДАНОВИЧ

ПРИЖИВЛЯЕМОСТЬ ЗАМОРОЖЕННО-ОТТАЯННЫХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В СВЯЗИ С ИХ ПОДГОТОВКОЙ ДЛЯ ПРЯМОЙ ПЕРЕСАДКИ РЕЦИПИЕНТАМ

РУП «Научно-практический центр национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

Разработан метод прямой (без удаления криопротектора) пересадки зародышей, основанный на использовании оптимальных защитных сред и режимов охлаждения при криоконсервировании эмбрионов различных стадий развития, позволяющий диагностировать стельность у реципиентов после трансплантации биоматериала в 54,2-56,0 % случаев.

Ключевые слова: эмбрион, криопротектор, глицерин, этиленгликоль, криоконсервирование, морула, бластоциста.

A.I. BUDEVICH, S.N. PAYTEROV, S.A. SAPSALEV, Y.K. KIRIKOVICH,
T.N. LUKASHEVICH, I.V. MIHEDOVA, P.E. SAHONCHIK, V.V. ZHDANOVICH

ACCEPTABILITY OF FROZEN-THAWED CATTLE EMBRYOS IN RELATION TO THEIR PREPARATION FOR DIRECT TRANSPLANTATION INTO RECIPIENTS

RUE «Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences
of Belarus on Animal husbandry»

Method of direct (without removing the cryoprotectant) transplantation of embryos was developed. The method is based on the use of protective environments and optimal cooling conditions at cryopreservation of embryos at different developmental stages, allowing diagnostic of pregnancy in recipients after transplantation of biomaterial is 54,2-56,0 % of cases.

Keywords: embryo, cryoprotectant, glycerol, ethylene glycol, cryopreservation, morula, blastocyst.

Введение. Мировой опыт свидетельствует, что трансплантация эмбрионов может ускорить селекционный прогресс в молочном скотоводстве в несколько раз по сравнению с традиционными методами разведения путем интенсивного отбора, точности оценки матерей быков и эффективного использования производителей.

Одним из важнейших технологических элементов трансплантации зародышей является возможность их замораживания и хранения без существенных потерь после оттаивания. Вместе с тем, 15-20%-ная браковка эмбриоматериала и снижение уровня приживляемости эмбрионов у реципиентов являются также недостатками технологии, которые не способствуют рациональному использованию эмбриопродукции в селекционном процессе. Поэтому совершенствование способов сохранения и пересадки эмбрионов различных стадий развития и качества для повышения эффективности технологии криоконсервирования зародышей позволит значительно сократить затраты на проведение работ по трансплантации.

Известно, что замораживание и последующее оттаивание эмбрионов животных представляют собой взаимосвязанный комплекс физико-химических процессов, характеризующихся водо- и теплообменом между клеткой и окружающей средой, при котором жидкие компоненты клетки переходят в твердое состояние и наоборот. Жизнеспособные зародыши содержат до 70-80 % воды, что делает их чувствительными при охлаждении к температурам, при которых вода подвергается фазово-структурным изменениям. Кристаллизация водной составляющей эмбриона приводит к разрушению внутриклеточных связей, оболочки и последующей его гибели. При этом существенную роль при заморозке клеток животных играет скорость охлаждения. Медленное замораживание до $-60-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ со скоростью охлаждения $0,13-0,16\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ сопровождается более полным обезвоживанием клетки, что препятствует образованию внутриклеточных кристаллов, с последующим переходом эмбриона в твердое состояние. Такой способ замораживания зародышей предполагает и медленное оттаивание. Его соблюдение позволяет сохранить на достаточно высоком уровне основные физико-химические и физиологические функции клетки. Режим быстрого замораживания клетки со скоростью снижения температуры $0,6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ подразумевает и быстрое оттаивание эмбрионов – за 10-12 секунд. При этом показатель их сохранности достигает 80 %. Поэтому поиск оптимальных режимов замораживания эмбрионов, которые обеспечивают постепенное дообезвоживание клеток и подготовку их переноса в жидкий азот, а также выбор оптимального режима оттаивания и культивирования деконсервированных зародышей являются необходимыми условиями сохранения их высокого качества.

Разработанный в 1984 году Leibo SP [1] метод прямой пересадки (direct transfer) эмбрионов крупного скота позволяет, используя этиленгликоль, пропиленгликоль или глицерин в качестве криопротекторов и сахарозу для нивелирования осмотического шока клетки при ее деконсервировании, произвести пересадку оттаянных клеток без по-

следующих регидратаций в отличие от традиционной методики, предполагающей извлечение биоматериала из пайетт, многократной отмывкой от криофилактика, повторной заправкой в соломинку и трансплантацией реципиенту. При этом от момента оттаивания зародыша до его пересадки животному проходит от 30 до 40 минут. В то же время, при использовании метода прямой пересадки эмбрион достигает места имплантации в роге матки реципиента спустя 3-5 минут после его оттаивания [2, 3].

Однако унификация методов эмбриотрансплантации, в том числе и прямой пересадки, не позволяет учитывать в технологии криоконсервирования зародышей их стадию развития, то есть целесообразность использования различных криопротекторов в зависимости от возраста клеток (морулы или бластоцисты), их качества. При этом скорость снижения температуры, а также использование различных питательных и поддерживающих сред при одношаговой (one-step-straw) методике их регидратации или без нее могут оказаться во многих случаях негативно действующими факторами, приводящими к потере биоматериала.

Разработка новых элементов способа прямой нехирургической пересадки эмбрионов крупного рогатого скота, а также совершенствование существующих позволит дифференцированно подойти к методике криоконсервирования биоматериала: отбору клеток, подбору криофилактиков, поддерживающих сред и их соотношения для замораживания и оттаивания зародышей различных стадий развития, скорости снижения температуры; упростить методику деконсервирования клеток, что обеспечит возможность проводить эмбриопересадки любому специалисту, владеющему техникой ректоцервикального осеменения коров и телок.

В связи с этим целью наших исследований явилось изучение сохранности и приживляемости зародышей крупного рогатого скота с учетом их подготовки для прямой пересадки реципиентам.

Материал и методика исследований. Исследования проведены в 2011-2012 гг. в РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», а также в племенных хозяйствах Республики: УП «Племенной завод «Кореличи» Гродненской области, УП «Племенной завод «Красная Звезда», РДУП «ЖодиноАгроПлемЭлита», СПК «Агрокомбинат «Снов» Минской области. В качестве доноров эмбрионов использовались клинически здоровые коровы (127 голов) белорусской черно-пестрой породы в возрасте от 4 до 8 лет, живой массой 550-650 кг с удоем по наивысшей лактации не ниже 10000 кг молока в год, жирностью 3,6 % и более. Для вызывания суперовуляции коровам-донорам инъецировали гонадотропные препара-

ты: ФСГ-супер (Россия) в дозе 50 единиц по Арморвскому стандарту или PLUSET (Испания) в дозе 250 М.Е., ФСГ с 250 М.Е. ЛГ в сочетании с аналогом простагландина F₂α-фертадин (РБ) в дозе 750 мкг. Гонадотропин инъекцировали на 9-11-й день полового цикла в течение 4 дней дважды с интервалом между обработками 12 часов при наличии хорошо выраженного желтого тела. Контроль охоты проводили дважды в день на прогулке животных по наличию рефлекса неподвижности. Коров-доноров осеменяли заморожено-оттаянной спермой с интервалом 10-12 часов [4]. Извлечение эмбрионов (морулы (МО) или бластоцисты (BL)) проводили на 7-й день после первого осеменения нехирургическим способом. Зародыши извлекали с использованием двухканальных катетеров фирмы «Нойштадт» (ФРГ) согласно методическим рекомендациям [5]. Кормление подопытных животных проводилось по рационам, принятым в хозяйствах.

С целью изучения степени влияния различных криопротекторов и режимов криоконсервирования на жизнеспособность зародышей крупного рогатого скота применяли стандартные криофилактики – 1,4М глицерин и 1,5М этиленгликоль (EMCARE, ICPbio Reproduction, New Zealand). Замораживанию подвергали эмбрионы отличного и хорошего качества на программном замораживателе CryoLogic CL-8800. При первом режиме криоконсервирования снижение температуры происходило со скоростью 0,6 °С/мин до -36 °С. Второй режим предполагал охлаждение клеток со скоростью 0,3 °С/мин до -36 °С с последующим свободным падением температуры до -120 °С со скоростью 10 °С/мин и переносом эмбрионов в жидкий азот.

В качестве контроля служили зародыши аналогичных стадий развития, что и в опытных группах, замороженные согласно методике криоконсервирования эмбрионов, предложенной РУП «Институт животноводства Национальной академии наук Беларуси» (2004 г.) [6].

Оттаивание зародышей контрольной и опытных групп проводили по общепринятой в эмбриотрансплантации методике: после извлечения из жидкого азота пайетты с эмбрионом выдерживали на воздухе при комнатной температуре 10-12 секунд с последующим переносом в водяную баню при 37 °С на 10-12 секунд. Регидратацию зародышей контрольной группы проводили по 4-ступенчатой методике, согласно методическим рекомендациям по криоконсервированию эмбрионов крупного рогатого скота (2004 г.). Пайетты с биоматериалом опытных групп после оттаивания встряхивали для смешивания растворов внутри соломинки и выдерживали при температуре 37 °С в течение 5-15 минут. После этого пайетту вскрывали и под 56-63-кратном увеличении микроскопа оценивали качество деконсервированного биоматериала. Хорошее или отличное качество извлеченного из пайетты заро-

дыша позволяло сделать заключение о целесообразности его прямой, без удаления криопротектора, пересадки.

На основании лучших результатов, полученных в предыдущих исследованиях, было произведено криоконсервирование эмбрионов различных стадий развития с последующим их оттаиванием и прямой пересадкой реципиентам. Уровень приживляемости биоматериала служил объективным показателем эффективности прямой пересадки. Полученные экспериментальные данные были биометрически обработаны общепринятыми методами вариационной статистики.

Результаты эксперимента и их обсуждение. На первом этапе исследований было изучено влияние скорости снижения температуры при криоконсервировании эмбрионов крупного рогатого скота разных стадий развития в 1,5М этиленгликоле на их последующую сохранность после оттаивания (таблица 1).

Установлено, что наибольшая выбраковка эмбрионов после оттаивания наблюдалась среди морул, замороженных с использованием первого режима снижения температуры (33,3 %). У зародышей аналогичной стадии развития, криоконсервированных при втором режиме, данный показатель был на уровне 100 %. В целом, пригодными к дальнейшей пересадке по первой и второй группам морул было признано 66,7 и 100 % клеток, соответственно. По группам бластоцист пригодными к дальнейшему использованию оказалось, в среднем, 88,9% клеток.

Таблица 1 – Сохранность зародышей, замороженных с разной скоростью охлаждения в 1,5М этиленгликоле

Показатели	1-й режим криоконсервирования			2-й режим криоконсервирования		
	стадия развития		Всего	стадия развития		Всего
	МО	BL		МО	BL	
Заморожено эмбрионов, n	9	11	20	11	13	24
Оттаяно эмбрионов, n	9	11	20	11	13	24
Пригодных к пересадке, n	7±1,6	9±1,9	16±1,2	10±1,7	13±2,1	23±1,4
Сохранность, %	77,8	81,8	77,8 ±9,29	90,9	100	95,8 ±4,09

Отмечена тенденция в более высокой жизнеспособности биоматериала при снижении температуры со скоростью 0,3 °С/мин при криоконсервировании эмбрионов крупного рогатого скота. При этом после оттаивания сохранность зародышей отмечена на уровне 95,0 %, в отличие от второго режима заморозки, при котором сохранность деконсервированных клеток была меньше на 17,2 % и составила 77,8 %.

Данные о качестве оттаянных зародышей в зависимости от скорости снижения температуры при их криоконсервировании представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Качественный состав деконсервированных эмбрионов при использовании различных режимов их заморозки

Показатели		1-й режим криоконсервирования						2-й режим криоконсервирования					
		стадия развития				Всего		стадия развития				Всего	
		МО		BL				МО		BL			
		До	После	До	После	До	После	До	После	До	После	До	После
Количество эмбрионов	n	9	9	9	9	18	18	11	11	9	9	20	20
	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
в т. ч. отличных	n	5	3	6	5	11	8	6	6	5	5	11	11
	%	55,6	33,3	66,7	55,6	61,1	44,4	54,5	54,5	55,6	55,6	55,0	55,0
Хороших	n	4	1	3	2	7	3	5	5	4	3	9	8
	%	44,4	11,2	33,3	22,2	38,9	16,7	45,5	45,5	44,4	33,3	45,0	40,0
Удовлетворительных	n	-	2	-	1	-	3	-	-	-	-	-	-
	%	-	22,2	-	11,1	-	16,7	-	-	-	-	-	-
Неудовлетворительных	n	-	3	-	1	-	4	-	-	-	1	-	1
	%	-	33,3	-	11,1	-	22,2	-	-	-	11,1	-	5,0
Средний балл		4,56 ± 0,18	3,44 ± 0,44	4,67 ± 0,17	4,22 ± 0,36	4,61 ± 0,12	3,83 ± 0,29	4,60 ± 0,16	4,60 ± 0,16**	4,56 ± 0,18	4,33 ± 0,33	4,55 ± 0,11	4,45 ± 0,17*
Снижение баллов		1,12		0,45		0,78		0		0,23		0,1	

Полученные результаты свидетельствуют о том, что по группе эмбрионов на стадии морулы, замороженных при первом режиме, произошли изменения в основном из-за снижения качества биоматериала до удовлетворительного и гибели части клеток. При этом были признаны непригодными к пересадке 33,3 % зародышей. В то же время, использование при криоконсервировании эмбрионов второго режима позволило в 100 % случаев сохранить качественный и количественный состав клеток после их оттаивания. Среднее снижение балльной оценки зародышей после оттаивания составило 1,12 ($P < 0,01$). По группе эмбрионов на стадии бластоцисты в контроле и опыте были оценены как неудовлетворительные по 11,1 % зародышей. В целом по контрольной группе было выбраковано 22,2 % эмбрионов, в то время как в опытной группе этот показатель не превысил 5 % зародышей. При этом уровень сохранности эмбрионов после криоконсервирования во второй опытной группе при этом составил 95,0 %, в первой, соответственно, 77,8%,

а среднее снижение баллов после оттаивания составило 0,78 ($P < 0,05$).

С целью изучения степени влияния скорости охлаждения эмбрионов, 1М сахарозы и поддерживающей среды при криоконсервировании ранних (BL-I) и поздних (BL-II) бластоцист в 1,5М этиленгликоле или 1,4М растворе глицерина на их качество после оттаивания было сформировано 4 опытные группы. В первой опытной группе последовательность растворов при заправке бластоцист в пайетту была следующей: Holding, этиленгликоль 1,5М с эмбрионом, культуральная среда (Holding) в соотношении 1:1:1; во второй – поддерживающая среда (Holding), глицерин 1,4М с эмбрионом, 1М сахара, поддерживающая среда (Holding) в соотношении 1:1:1:1. При этом скорость снижения температуры при замораживании эмбриоматериала была 0,3 и 0,6 °С/мин. Полученные данные представлены, соответственно, в таблицах 3 и 4.

Результаты, представленные в таблице 3, указывают на то, что использование 1,5М раствора этиленгликоля или сахарозы с 1,4М раствором глицерина со скоростью снижения температуры 0,3 °С/мин позволяет в должной мере обеспечить сохранность бластоцист различных стадий развития после оттаивания. В первой и второй опытных группах признано пригодными к трансплантации 91,7 % клеток. На стадии ранней бластоцисты второй и поздней бластоцисты первой опытной группы по причине лизиса было выбраковано 16,7 и 14,3 % эмбрионов, соответственно.

Таблица 3 – Эффективность криоконсервирования бластоцист в 1,5М этиленгликоле и 1,4М глицерине при скорости охлаждения 0,3 °С/мин

Показатели	Первая группа 1,5М этиленгликоль			Вторая группа 1,4М глицерин		
	стадия развития		Все- го	стадия развития		Все- го
	BL-I	BL-II		BL-I	BL-II	
Заморожено эмбрионов, n	5	7	12	6	6	12
Оттаяно эмбрионов, n	5	7	12	6	6	12
Пригодных к пересадке, n	5	6	11	5	6	11
Сохранность, %	100	85,7	91,7	83,3	100	91,7

Результаты исследований, отраженные в таблице 4, свидетельствуют о том, что во второй опытной группе признано пригодными к пересадке 92,3 % бластоцист, что незначительно (она 0,6 %) выше, чем в первой опытной группе. При этом выбраковано на стадии ранней бла-

стоицы по причине гибели от 16,7 до 20,0 % клеток, соответственно. Таким образом, скорость охлаждения зародышей 0,3 или 0,6 °С/мин на стадии бластоцисты при их криоконсервировании в 1,4М растворе глицерина или 1,5М растворе этиленгликоля не оказывает существенного влияния на их сохранность после оттаивания. При этом признано пригодными к дальнейшей трансплантации от 90,9 до 92,3 % бластоцист, что сопоставимо с данными по сохранности клеток данной стадии развития при их криоконсервировании принятыми технологией трансплантации эмбрионов методами.

Таблица 4 – Эффективность криоконсервирования бластоцист в 1,5М этиленгликоле и 1,4М глицерине при скорости охлаждения 0,6 °С/мин

Показатели	Первая группа 1,5М этиленгли- коль		Все- го	Вторая группа 1,4М глицерин		Все- го
	стадия раз- вития			стадия раз- вития		
	BL-I	BL-II	BL-I	BL-II		
Заморожено эмбрионов, n	6	6	12	5	8	13
Оттаяно эмбрионов, n	6	6	12	5	8	13
Пригодных к пересадке, n	5	6	11	4	8	12
Сохранность, %	83,3	100	91,7	80,0	100	92,3

Кроме этого был изучен качественный состав оттаянных ранних и поздних бластоцист, замороженных в 1,4М растворе глицерина и в 1,5М этиленгликоле с различной скоростью снижения температуры. Полученные результаты исследований представлены в таблице 5.

Данные таблицы указывают на то, что количество пригодных к пересадке зародышей, замороженных в 1,5М растворе этиленгликоля со скоростью снижения температуры 0,3 и 0,6 °С/мин, после оттаивания составило 91,7 %. При этом качество деконсервированного биоматериала снизилось, соответственно, на 0,42 и 0,58 балла.

Пригодность к трансплантации ранних и поздних бластоцист существенно не изменилась от первоначального и снизилась на 0,4-0,42 балла после криоконсервирования клеток на скорости 0,3 °С/мин, что на 0,26-0,11 балла меньше по сравнению с заморозкой эмбрионов аналогичных стадий развития на скорости 0,6 °С/мин. Кроме этого, количество трансплантационных зародышей, замороженных в 1,4М растворе глицерина со скоростью снижения температуры 0,3 и 0,6 °С/мин, составило, соответственно, 91,7 и 92,3 %. При этом качество оттаянно-

Таблица 5 – Влияние скорости охлаждения на качество blastocист после оттаивания

Показатели		Скорость криоконсервирования 0,3 °С/мин										Скорость криоконсервирования 0,6 °С/мин													
		1,5М этиленгликоль					1,4М глицерин					1,5М этиленгликоль					1,4М глицерин								
		Стадия развития		Всего		Стадия развития		Всего		Стадия развития		Всего		Стадия развития		Всего		Стадия развития		Всего		Стадия развития		Всего	
До заморозки	После оттаивания	До заморозки	После оттаивания	До заморозки	После оттаивания	До заморозки	После оттаивания	До заморозки	После оттаивания	До заморозки	После оттаивания	До заморозки	После оттаивания	До заморозки	После оттаивания	До заморозки	После оттаивания	До заморозки	После оттаивания	До заморозки	После оттаивания	До заморозки	После оттаивания		
Количество эмбрионов	п	5	5	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	
в т. ч.	%	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
отличных	п	4	3	5	4	9	7	5	3	4	4	9	7	5	3	4	3	9	6	3	2	7	6	10	
	%	80,0	60,0	71,4	57,1	75,0	58,4	83,3	50,0	80,0	81,8	58,4	83,3	50,0	66,7	50,0	75,0	50,0	60,0	40,0	87,5	75,0	76,9	61,5	
Хороших	п	1	1	2	2	3	3	1	2	1	1	2	3	1	2	2	3	4	2	2	1	2	3	4	
	%	20,0	20,0	28,6	28,6	25,0	25,0	16,7	33,3	20,0	20,0	18,2	25,0	16,7	33,3	33,3	25,0	33,3	40,0	40,0	12,5	25,0	23,1	30,8	
Удовлетворительных	п	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	
	%	-	20,0	-	-	-	-	-	-	-	20,0	-	-	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	
Неудовлетворительных	п	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1	-	-	1	
	%	-	-	-	14,3	-	8,3	-	16,7	-	-	-	8,3	-	16,7	-	16,7	-	16,7	-	20,0	-	-	7,7	
Средний балл		4,8 ± 0,2	4,4 ± 0,18	4,71 ± 0,18	4,29 ± 0,42	4,75 ± 0,13	4,33 ± 0,28	4,83 ± 0,17	4,17 ± 0,48	4,8 ± 0,2	4,5 ± 0,32	4,33 ± 0,28	4,83 ± 0,17	4,17 ± 0,48	4,17 ± 0,21	4,67 ± 0,21	4,17 ± 0,48	4,75 ± 0,13	4,17 ± 0,24	4,6 ± 0,55	4,0 ± 0,13	4,88 ± 0,16	4,75 ± 0,12	4,46 ± 0,24	
Снижение баллов после оттаивания		0,4	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42	0,66	0,3	0,49	0,66	0,55	0,58	0,6	0,13	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31	0,31

го эмбриоматериала снизилось, соответственно, на 0,49 и 0,31 балла.

Жизнеспособность ранних и поздних бластоцист после деконсервирования существенно не изменилась от первоначального и снизилась на 0,66-0,3 балла после замораживания клеток на скорости 0,3 °С/мин, по сравнению с 0,6-0,13 балла при криоконсервации эмбрионов аналогичных стадий развития на скорости 0,6 °С/мин.

Можно заключить, что процесс криоконсервирования бластоцист в 1,5М растворе этиленгликоля или в 1,4М глицерине со скоростью снижения температуры 0,3 или 0,6 °С/мин позволяет полноценно сохранять эмбриоматериал после оттаивания.

На заключительном этапе исследований была изучена эффективность технологии прямой трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота реципиентам. С этой целью на основании лучших результатов, полученных в предыдущих исследованиях, было произведено криоконсервирование эмбрионов различных стадий развития с последующим их оттаиванием и прямой пересадкой реципиентам. В качестве контроля служили эмбрионы, замораживание и оттаивание которых осуществлялось согласно методическим рекомендациям по криоконсервированию зародышей крупного рогатого скота в молочном и мясном скотоводстве. Результаты приживляемости биоматериала представлены в таблицах 6 и 7. Данные таблицы 6 указывают на то, что уровень приживляемости деконсервированного эмбриоматериала, пересаженного методом прямой трансплантации реципиентам, на 14,2 % выше в отличие от традиционного (с использованием способа поэтапного выведения раствора глицерина). Были признаны стельными 40,0 и 54,2 % реципиентов, соответственно. При этом приживляемость ранних морул опытной группы была достоверно выше ($P < 0,05$) по данному показателю у эмбрионов аналогичной стадии развития в контроле и находилась на уровне 54,5 % (против 33,3 %).

Таблица 6 – Эффективность прямой пересадки морул, замороженных в 1,4М растворе глицерина с добавлением 1М раствора сахарозы

Показатели	Контрольная группа			Опытная группа		
	Стадия развития зародышей					
	МО- I	МО- II	Все- го	МО- I	МО- II	Все- го
1	2	3	4	5	6	7
Заморожено эмбрионов, n	9	11	20	11	13	24
Оттаяно пайетт, n	9	11	20	11	13	24

Продолжение таблицы 6

1	2	3	4	5	6	7
Пересажено, эмбрионов, n	9	11	20	11	13	24
Стельных реципиентов, n	3	5	8	6	7	13
Уровень приживляемости, %	33,3 ±5,3	45,5 ±6,2	40,0 ±6,0	54,5 ±7,1*	53,8 ±8,4	54,2 ±8,6

*P<0,05

Результаты эксперимента, представленные в таблице 7, позволяют сделать заключение о возможности использования метода прямой пересадки blastocyst, замороженных в 1,5M раствора этиленгликоля в сочетании с поддерживающей средой в соотношении 1:1:1 или 2:1:2. Стельность у реципиентов опытной группы была диагностирована в 56,0 % случаев, что на 8,2 % выше, чем в контроле. Кроме этого, было отмечено существенное снижение уровня приживляемости ранних и поздних blastocyst в контрольной группе по сравнению с опытной – на 8,2 и 8,3 %, соответственно.

Таблица 7 – Эффективность прямой пересадки blastocyst, замороженных в 1,5M растворе этиленгликоля

Показатели	Контрольная группа			Опытная группа		
	Стадия развития зародышей					
	BL-I	BL-II	Всего	BL-I	BL-II	Всего
Заморожено эмбрионов, n	11	12	23	13	12	25
Оттаяно пайетт, n	11	12	23	13	12	25
Пересажено, эмбрионов, n	11	12	23	13	12	25
Стельных реципиентов, n	5	6	11	7	7	14
Уровень приживляемости, %	45,6 ±6,4	50,0 ±7,1	47,8 ±7,2	53,8 ±6,9	58,3 ±8,5	56,0 ±8,1

Сравнительная эффективность традиционного метода пересадки эмбрионов и прямого представлена в таблице 8.

Данные, отраженные в таблице, позволяют заключить, что использование разных криопротекторов (1,4M раствор глицерина или 1,5M раствор этиленгликоля) и режимов замораживания (0,3 °C/мин. или 0,6 °C/мин.) для морул или blastocyst позволяет в должной мере сохранить жизнеспособность эмбриоматериала после оттаивания и, как

следствие, увеличить его приживляемость у реципиентов.

Таблица 8 – Результативность трансплантации эмбрионов прямым и традиционным методами

Показатели	Контрольная группа			Опытная группа		
	Стадия развития зародышей					
	МО	BL	Всего	МО	BL	Всего
Заморожено эмбрионов, n	20	23	43	24	25	49
Оттаяно пайетт, n	20	23	43	24	25	49
Пересажено, эмбрионов, n	20	23	43	24	25	49
Стельных реципиентов, n	8	11	19	13	14	27
Уровень приживляемости, %	40,0 ±6,0	47,8 ±7,2	44,2 ±7,3	54,2 ±8,6	56,0 ±8,1	55,1 ±8,0

В целом, было диагностировано 55,1 % случаев стельности у животных опытной группы, что на 10,9 % выше по сравнению с контролем.

Таким образом, можно заключить, что способ криоконсервирования зародышей в 1,4М растворе глицерина с добавлением 1М раствора сахарозы и холдинга при заправке пайетт в соотношении 1:1:1:1 или в 1,5М растворе этиленгликоля в сочетании с поддерживающей средой в соотношении 1:1:1 или 2:1:2 может быть использован с целью прямой пересадки реципиентам.

Заключение. 1. Подбор оптимальных защитных сред и их соотношений, а также режимов замораживания и оттаивания эмбриоматериала позволил получить показатель приживляемости эмбрионов, пересаженных прямой трансплантацией, сравнимый с традиционным методом подготовки зародышей. Разработан метод прямой пересадки эмбрионов, позволяющий диагностировать стельность у реципиентов после трансплантации биоматериала в 54,2-56,0 % случаев.

2. Применение для криоконсервирования морул технологии с использованием этиленгликоля и питательной среды в соотношении 1:1:1 или 2:1:2 позволяет в 100 % случаев сохранить жизнеспособность клеток при незначительном (0,2-0,29 балла) снижении их качества. Замораживание blastocyst, предусматривающее применение растворов этиленгликоля и глицерина со скоростью снижения температуры 0,3 или 0,6 °С/мин, позволяет, соответственно, в 91,7-92,3 % случаев получить пригодные для пересадки клетки при незначительном (на 0,13-0,66 балла) снижении их качественных характеристик. Данные прото-

колы криоконсервирования возможно использовать в технологии прямой трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота.

3. С целью повышения эффективности технологии трансплантации эмбрионов рекомендуется применение протокола криоконсервирования blastocysts в 1,5М растворе этиленгликоля при скорости снижения температуры 0,6 °С/мин с последующей прямой трансплантацией биоматериала данной стадии развития.

Литература

1. Leibo, S. P. A one-step method for direct non-surgical transfer of frozen-thawed bovine embryos / S. P. Leibo // *Theriogenology*. – 1984. – Vol. 21. – P. 767-790.
2. Voelkel, S. A. Direct transfer of frozenthawed bovine embryos / S. A. Voelkel, Y. X. Hu // *Theriogenology*. – 1992. – Vol. 37(1). – P. 23-37.
3. Leibo, S. P. Direct transfer of cryopreserved cattle embryos in North America / S. P. Leibo, R. J. Mapletoft // *Proc. 17th Annual Convention of the American Embryo Transfer Association (AETA)*. – NY, 1998. – P. 91-98.
4. Инструкция по искусственному осеменению коров и телок. – Мн., 1999. – 54 с.
5. Технология трансплантации эмбрионов в молочном и мясном скотоводстве : методические рек. / И. И. Будевич [и др.]. – Жодино, 2002. – 33 с.
6. Технология трансплантации эмбрионов в молочном и мясном скотоводстве : методические рек. / И. И. Будевич [и др.]. – Жодино, 2004. – 33 с.

Поступила 18.03.2014 г.

УДК 636.424.082.12

О.Я. ВАСИЛЮК, Н.А. ЛОБАН, С.М. КВАШЕВИЧ

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ СВИНЕЙ БЕЛОРУССКОЙ КРУПНОЙ БЕЛОЙ ПОРОДЫ

РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук
Беларуси по животноводству»

На основе частотности встречаемости аллелей генов-маркеров продуктивных качеств свиней белорусской крупной белой породы (RYR1, ESR, ECRF18, H-FABP, IGF-2) построен их генетический профиль. Проведен сравнительный анализ фактического и эталонного генетических профилей свиней породы, установлены взаимосвязи и предложены дальнейшие варианты работы по повышению продуктивных качеств свиней белорусской крупной белой породы.

Ключевые слова: генетика, белорусская крупная белая порода свиней, гены-маркеры продуктивных качеств, генетический профиль.