

8. Bjornstad A., Skinnes H. Genetic studies of anther culture derived lines in barley // Proc. Six Intern. Barley Genet. Symp. (July 22-27 1991). – Helsingborg, 1991. – v. 1. – P. 191–193.
9. Методические указания по изучению мировой коллекции ячменя и овса / Под ред В.Д. Кобылянского и Ф. Я. Трофимовской. – Л.: ВИР, 1981. – 92 с.
10. Белинская Е.В. Влияние генотипа родительских компонентов исходной гибридной популяции и отбора в культуре пыльников *in vitro* на андрогенную способность дигаплоидных линий ячменя // Молекулярная генетика и биотехнология: Материалы Международной конференции (6–8 апреля 1998 г.). – Минск, 1998. – С. 143–144.
11. Кильчевский А.В., Хотылева Л.В. Экологическая селекция растений.– Мн.: Технология, 1997. – 372 с.

Резюме

Досліджено мінливість ознак продуктивності і якості зерна у популяції ліній подвоєних гаплоїдів ярого ячменю, одержаних методом культури пиляків на основі гібридів сортів з контрастною здатністю до андрогенезу *in vitro*. Виявлено тенденцію переважного успадкування лініями гібридного походження комплексу ознак батьківської форми з більш високими показниками гаплопродукції, прояв якої залежав від агрометеорологічних умов у період вегетації.

Изучена изменчивость признаков продуктивности и качества зерна в популяции линий удвоенных гаплоидов ярого ячменя, полученных методом культуры пыльников на основе гибридов сортов с контрастной способностью к андрогенезу *in vitro*. Выявлена тенденция преимущественного наследования андрогенными линиями гибридного происхождения признаков родительской формы с более высокими показателями гаплопродукции, проявление которой зависело от агрометеорологических условий в период вегетации.

Variability of yield structure components and grain quality in spring barley population of DH-lines produced via anther culture *in vitro* from hybrids of cultivars with a contrast capacity to androgenesis *in vitro* was investigated. A tendency to preferential inheritance by androgenic doubled haploids agronomic traits of the parental form possessing higher culturability was revealed. But this tendency depended on agrometeorological conditions in vegetation period.

ГУЗЕВАТИЙ О.Є.¹, ТРОЦЬКИЙ П.А.²

¹Українська академія аграрних наук, Україна, 01010, м. Київ, вул. Суворова, 9,
E-mail: oleg_guzevatiy@ukr.net

²Інститут розведення і генетики тварин УААН, Україна, 08321, Київська обл.,
Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1

ЗАСТОСУВАННЯ РІЗНИХ КУЛЬТУРАЛЬНИХ СИСТЕМ ДЛЯ ПОДАЛЬШОГО РОЗВИТКУ ЗАРОДКІВ, ОТРИМАНИХ *IN VITRO* З ДЕКОНСЕРВОВАНИХ ООЦИТІВ

Для сучасної агробіотехнології характерний комплексний підхід, зокрема як широке застосування низки методів досліджень, таких як молекулярно-біологічних, кріобіологічних, ембріологічних, фізіологічних тощо, так і вирішення широкого спектра господарських завдань. В тваринництві сучасні методи біотехнології створюють значні перспективи для підвищення і розширення можливостей селекції і відтворення сільськогосподарських тварин [1, 2]. Нині значна увага приділяється дослідженням, що пов'язані з отриманням *in vitro* ембріонів сільськогосподарських тварин, в першу чергу великої рогатої худоби, на основі використання методів культивування і запліднення *in vitro*, кріоконсервування, визначення і регуляції статі тощо [3, 4, 5]. Заморожування гамет і ембріонів сільськогосподарських тварин відкрило нову еру біотехнологічних методів збереження і відтворення тварин. Заморожування в рідкому азоті при -196°C створило можливість фактично необмеженого зберігання, транспортування і використання біологічного матеріалу для досліджень у будь-яких галузях науки [6- 10].

Метою досліджень була оцінка застосування різних культуральних систем для подальшого розвитку в умовах *in vitro* ембріонів великої рогатої худоби, отриманих з деконсервованих ооцитів.

Матеріал і методи

Об'єктом експериментальних досліджень були ооцит-кумулясні комплекси корів чорно-рябої породи. Ооцити отримували шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів, вимивали середовищем Дюльбекко, виловлювали пастерівською піпеткою та оцінювали за морфологічними ознаками. Для заморожування використовували ооцити з гомогенною тонкозернистою ооплазмою, неушкодженою прозорою оболонкою, щільним або частково розпушеним кумулюсом.

Перед заморожуванням гамети корів і свиноматок обробляли еквілібраційним розчином, а потім переносили у вітрифікаційний розчин. Всі еквілібраційні (10% гліцерин + 20% пропандіол) та вітрифікаційні (25% гліцерин + 25% пропандіол) розчини для кріоконсервування ооцит-кумулясних комплексів корів були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбекко з додаванням 20% фетальної сироватки.

Після розморожування гамет виведення кріопротекторів з них проводили шляхом перенесення їх на 10 хвилин у розчин 1,0 М сахарози. Ооцит-кумулясні комплекси 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 ("Schering corporation"), 1,0 мкг/мл естрадіолу ("Serva"), 2,5 МОд/мл лютеїнізуючого гормону ("Serva"), 2,0 мМ натрія пірувату ("Sigma"), 2,92 мМ кальція лактату ("Sigma"), 40 мкг/мл гентаміцину.

Після дозрівання поза організмом нативні та деконсервовані яйцеклітини корів підлягали заплідненню *in vitro*. Для запліднення *in vitro* яйцеклітин корів використовували заморожену сперму бугая. Капацитацію сперматозоїдів здійснювали гепарином (100 од/мл) за методикою Parrish J.J. et al. [11]. Спільне інкубування яйцеклітин і сперматозоїдів проводили в термостаті при температурі 38,5°C, 5% CO₂ в повітрі, в краплях середовища Fert.-TALP. Після 12-18 годин спільного інкубування яйцеклітини і зиготи відмивали від прилиплої сперми і переносили в краплі середовища CDM для подальшого культивування.

Цитогенетичні препарати готували за методом Ushijima M. et al. [12], забарвлювали 10%-ним розчином Гімза ("Fluka") та досліджували під мікроскопом. Отримані результати статистичне обробляли з використанням критеріїв Стьюдента [13].

Результати та обговорення

Добір і застосування певних культуральних систем є одним з головних чинників, що забезпечують життєздатність і подальший розвиток поза організмом ооцитів, зигот і ембріонів [14, 15, 16]. В таблиці наведено результати розвитку ембріонів великої рогатої худоби, отриманих *in vitro* з деконсервованих ооцитів корів, за умов використання різних культуральних систем, а саме: у варіанті досліді А використовували моношар клітин гранульози, у варіанті досліді Б – кондиційоване середовище клітин гранульози, у варіанті досліді В – моношар клітин кумулюса, у варіанті досліді Г – кондиційоване середовище клітин кумулюса, варіант досліді К був контролем, в якому культивували зародки, отримані *in vitro* з нативних ооцит-кумулясних комплексів корів.

Таблиця

Використання різних культуральних систем для розвитку *in vitro* зародків великої рогатої худоби, отриманих з деконсервованих ооцитів

Варианти досліді	Кількість клітин, що підлягали заплідненню <i>in vitro</i>	Кількість ембріонів на стадії									
		2 клітин		3-4 клітин		5-8 клітин		9-16 клітин		морула + бластоциста	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
К	95	41	43,2 ^e ±5,1	35	36,8 ±4,9	30	31,6 ±4,8	24	25,2 ±4,5	12	12,6 ^g ±3,4

А	162	37	22,8 ^b ±3,3	30	18,5 ±3,1	23	14,2 ±2,7	16	9,9 ±2,3	4	2,5 ^f ±1,2
Б	177	22	12,4 ^{ac} ±2,5	12	6,8 ±1,9	5	2,8 ±1,2	3	1,7 ±0,9	–	–
В	153	33	21,6 ^b ±3,3	25	16,3 ±3,0	21	13,7 ±2,8	18	11,8 ±2,6	5	3,3 th ±1,4
Г	186	17	9,1 ^{ad} ±2,1	8	4,3 ±1,5	5	2,7 ±1,2	4	2,2 ±1,1	–	–

b : c, g : h – P < 0,05; a : b, f : g – P < 0,01; b : d, b : e, c : e, d : e – P < 0,001
(різні суперскрипти вказують на вірогідну різницю між показниками)

За результатами експериментальних досліджень встановлено, що деякі із застосованих культуральних систем по різному впливають на подальший розвиток запліднених *in vitro* деконсервованих і дозрілих поза організмом ооцитів корів. Ефективнішим при отриманні *in vitro* зародків великої рогатої худоби як ранніх (2-16 клітинні), так і на доімплантаційних стадіях їх розвитку (морула та бластоциста) виявилось застосування моношарів клітин гранульози (вар.А, 22,8 і 2,5% відповідно) та кумулюса (вар.В, 21,6 і 3,3% відповідно) порівняно з використанням кондиційованих середовищ гранульози (вар.Б, 12,4 і 0% відповідно) та кумулюса (вар.Г, 9,1 і 0% відповідно). В контрольній групі (без заморожування) показники *in vitro* отримання ембріонів великої рогатої худоби ранніх і доімплантаційних стадій розвитку становили відповідно 43,2 і 12,6%.

Таким чином, нині досягнуто певних успіхів з проблеми дозрівання, запліднення і подальшого культивування *in vitro* як нативних, так і деконсервованих гамет, отриманих з антральних фолікулів яєчників корів, що дозволяє отримувати значно більшу кількість необхідного біологічного матеріалу на різних стадіях їх розвитку від тварин з високим генетичним потенціалом як для наукових, так і для практичних цілей.

Висновки

Використання моношарів клітин гранульози та кумулюсу на відміну від застосування їх кондиційованих середовищ більш ефективно для подальшого розвитку в умовах *in vitro* зигот великої рогатої худоби, отриманих з деконсервованих ооцитів корів та сприяє збільшенню одержання зародків як ранніх так і доімплантаційних (морула та бластоциста) стадій їх розвитку відповідно на 10,4-12,5% та 2,5-3,3%.

Література

1. *Betteridge K.J.* Farm animal embryo technologies: achievements and perspectives// *Theriogenology.*- 2006.- Vol.65, I.5.- P.905-913.
2. *Руденко Є.В.* Роль і перспективи сучасних методів біотехнології в умовах інтенсифікації тваринництва / Є.В.Руденко, О.С.Гузеватий // Науково-технічний бюлетень.- Харків, 2008.- №96.- С.44-49.
3. *Bazer F.W.* Reproductive biology in the era of genomics biology / F.W.Bazer, T.E.Spencer // *Theriogenology.*- 2005.- Vol.64, I.3.- P.442-456.
4. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle / M.V.Wheeler, J.J.Rutledge, A.M.Brown et al. // *Theriogenology.*- 2006.- V.65, I.1.- P.219-227.
5. *Безуглий М.Д.* Розвиток біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин / М.Д.Безуглий, О.С.Гузеватий // Вісник аграрної науки.- 2006.- №12.- С.83-86.
6. *Vajta G.* Improving cryopreservation systems / G.Vajta, M.Kuwayama // *Theriogenology.*- 2006.- Vol.65, I.1.- P.236-244.
7. *Гузеватий О.С.* Заморожування ооцитів корів на різних стадіях мейотичного дозрівання та оцінка їх життєздатності після деконсервування / О.С.Гузеватий, П.А.Троцький // Науково-технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДКДКІ ветпрепаратів та кормових добавок.- Львів, 2007.- Вип.8, №1-2.- С.287-291.
8. *Seidel G.E., Jr.* Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation // *Theriogenology.*- 2006.- Vol.65, I.1.- P.228-235.

9. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин / М.Д.Безуглий.- Харків, 2002.- 155с.
10. Woods E.J. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissue / E.J.Woods, J.D.Benson, Y.Aga, J.K.Crister // Cryobiology.- 2004.- Vol.48.- P.146-156.
11. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid /Parrish J.J., Sushko-Parrish J.L., Handron R.R. et al. // Biol.Reprod.- 1989.- Vol.40.- P.1020-1025.
12. Relationship between the cell number and Quality of Day-8 bovine blastocysts /Ushijima M., Okuda M., Nakajama T. et al. // Proc. 3 rd East Jpn. Soc. Anim. Embr. Trans.- 1988.- №9.- P.37-38.
13. Лакин Г.Ф. Биометрия,- М.: Высшая школа, 1990.- 351 с.
14. Макарова З.Н. Роль культуральной среды в процессе получения эмбрионов коров вне организма / З.Н.Макарова, Т.Э.Позднякова, О.Е.Гузеватый // Бюл. науч. работ / ВНИИРГЖ.- 1985.- Вып.85.- С.27-29.
15. Hochi H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer // Theriogenology.- 2003.- V.59, I.2.- P.553-697.
16. Use of media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture / Lane N., Gardner D.K., Hasler M.J., Hasler J.F // Theriogenology.- 2003.- V.60, I.3.- P.407-419.

Резюме

Наведено результати експериментальних досліджень розвитку в різних культуральних системах ранніх ембріонів великої рогатої худоби, отриманих *in vitro* з деконсервованих ооцит-кумулюсних комплексів корів. Установлено, що застосування моношару клітин гранульози або кумулюса більш ефективно порівняно з кондиційованими середовищами для подальшого розвитку в умовах *in vitro* зигот великої рогатої худоби, отриманих з деконсервованих та дозрілих поза організмом ооцитів корів.

Приведены результаты экспериментальных исследований развития в различных культуральных системах ранних эмбрионов крупного рогатого скота, полученных *in vitro* из деконсервованных ооцит-кумулюсных комплексов коров. Встановлено, что применение монослоя клеток гранулёзы или кумулюса более эффективно по сравнению с кондиционированными средами для последующего развития в условиях *in vitro* зигот крупного рогатого скота, полученных из деконсервованных и дозревших вне организма ооцитов коров.

Results of experimental researches of development in the various cultural systems of early bovine embryos used *in vitro* from frozen-thawed bovine oocyte-cumulus complexes are resulted. It's set that application of monolayer of granulose or cumulus cells more effectively comparatively with conditions mediums for subsequent development of *in vitro* bovine zygote, used from frozen-thawed and matured *in vitro* bovine oocytes.

КИЩЕНКО Е.М., БЕЛОКУРОВА В.Б., ПАТОН Е.Б., КУЧУК Н.В.

*Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины,
Украина, 03680, г. Киев, ул. Заболотного, 148, e-mail: iicb@iicb.kiev.ua*

ПРОСТРЕЛ ЧЕРНЕЮЩИЙ (*PULSATILLA NIGRICANS* STORCK) КАК ОБЪЕКТ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Прострел чернеющий (*Pulsatilla nigricans* Storck.) семейства лютиковых (Ranunculaceae) – сокращающийся в численности, уязвимый вид, занесенный в Красную Книгу Украины (2-я категория). Растения этого вида издавна использовались в народной медицине при различных нервных и сердечнососудистых заболеваниях. На сегодняшний день прострел не относят к официальным препаратам, хотя он достаточно популярен в гомеопатии и применяется при заболеваниях нервной системы, кровообращения, желудочно-кишечного тракта и воспалительных процессах. Биологически активные вещества,