

12. Patel G.I., Olmo H.P. Induction of polyploidy in sterile F₁ hybrid of *Vitis vinifera* L. and *Vitis rotundifolia* Michx.// Phyton (B.A.)/- 1956/- vol. 7, № 2.- P.12-15.

Резюме

Используя метод аллополиплоидии и культуры зародышей *in vitro*, у винограда после межродовой гибридизации получены растения, но для установления истинности их межродового происхождения необходимы дополнительные молекулярно-генетический и цитогенетический анализы.

Використовуючи метод аллополіплоїдії і культури зародків *in vitro*, у винограду після міжродової гібридизації отримані рослини, але для встановлення істинності їх міжродового походження необхідні додаткові молекулярно-генетичний і цитогенетичний аналізи.

Plants were achieved from intergeneric hybridization in grapevine by use of the method of allopolyploidy and *in vitro* embryo culture. Nevertheless, their intergeneric origin needs to be confirmed by additional molecular genetic and cytogenetic analyses.

ЗЮЗІОН А.Б., КОВТУН С.І., ЩЕРБАК О.В., ПОРХУН М.Г.

Институт розведення і генетики тварин УААН

Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,

e-mail: kovtun_si@gala.net

ФОРМУВАННЯ ЕМБРІОНІВ *IN VITRO* ЯК СПОСІБ ОЦІНКИ ЗАПЛІДНЮВАЛЬНОЇ ЗДАТНОСТІ СПЕРМАТОЗОЇДІВ БУГАЇВ

Найпоширенішим методом визначення фертильності самців сільськогосподарських тварин є оцінка запліднювальної здатності сперматозоїдів за результатами штучного осіменіння корів і телиць [1, 2]. Вивчення лише фізіологічних параметрів сперми плідників не забезпечує повноцінної оцінки запліднювальної здатності сперматозоїдів сільськогосподарських тварин. Завершальна оцінка здатності сперматозоїдів до запліднення можлива на підставі результатів штучного осіменіння, що вимагає великих витрат і тривалості в часі [3, 4, 5].

Нині застосовуються сучасні автоматизовані аналізатори якості сперми сільськогосподарських тварин багатьох фірм, які визначають протягом 1 хв. основні параметри – загальну концентрацію гамет, їх рухливість, концентрацію рухливих сперматозоїдів, концентрацію з прямолінійно-поступальним рухом, середню швидкість сперматозоїдів, розрахунок кратності розбавлення для підготовки доз («Гамета-Агро», www.gameta.ru). Також аналізатори автоматично розраховують кількість гамет із нормальної морфологією, число нерухомих клітин і ін. («SFA – 500», www.biola.ru, www.labmetod.ru). Рекламуючи автоматизовані аналізатори якості сперми, виробники наголошують на мінімальних вимогах до знань оператора, який працює з ними. Необхідно поєднувати для детального розуміння закономірностей ефективної оцінки запліднювальної здатності сперми плідників загальнобіологічні знання закономірностей ембріонального розвитку тварин і їх відтворювальної здатності [6, 7].

До найбільш поширених методів оцінки якості сперми відносяться візуальна оцінка морфології, рухливості, концентрації і виживання сперматозоїдів, виявлення кількості живих та нежиттєздатних (мертвих, з коливальним рухом) спермій після забарвлення сперми розчином еозина. Недоліком багатьох методів є суб'єктивність при вимірюваннях. У зв'язку з цим виникла необхідність пошуку нових ефективних методів дослідження показників сперми [8, 9].

Для визначення запліднювальної здатності в умовах *in vitro* використовують методи гетерологічного і гомологічного запліднення. При гетерологічному заплідненні використовують оцити золотистого хом'яка [10, 11], що також не дає повної оцінки

запліднювальної здатності гамет бугаїв. Цей тест можна використовувати тільки при оцінці проходження сперматозоїдами процесу капацитації і акросомної реакції. Правильність структури хроматину сперматозоїдів є ознакою, на яку слід звертати увагу при оцінці фертильності плідників. Високий відсоток сперматозоїдів із пошкодженим хроматином негативно впливає на запліднювальну здатність, хоча інші показники можуть знаходитися на високому рівні.

Повнішу оцінку запліднювальної здатності сперматозоїдів дає моделювання процесів взаємодії гамет в умовах *in vitro* при гомологічному заплідненні. Цей метод передбачає використання ооцитів ссавців, які дозріли поза організмом. Таким чином можна встановити не тільки рівень пенетрації сперматозоїдами прозорої оболонки ооцитів, але і рівень формування чоловічого пронуклеусу, запліднення яйцеклітин, розвитку ембріонів до доімплантаційних стадій [12].

Враховуючи перспективність вищесказаного ми оцінили запліднювальну здатність сперматозоїдів бугаїв-плідників за результатами формування ембріонів поза організмом. В дослідженнях використано кріоконсервовані сперматозоїди бугаїв голштинської породи (Трипле 244, Гомер 200, Делец 185). Гамети бугаїв зберігаються у Банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин УААН відповідно з 1988, 1992 та 1984 року.

Матеріали і методи

Для одержання ооцит-кумулюсних комплексів на бойні відбирали яєчники від гінекологічно здорових корів та телиць. Видалення комплексів із фолікулів здійснювали шляхом розсічення їх скальпелем. Гамети культивували *in vitro* протягом 24 годин у середовищі для дозрівання – ТС 199 на розчині Ерла (Sigma), яке доповнювали 20 % еструсної сироватки крові корів власного приготування, 0,068 мг/мл канаміцину сульфату, 0,11 мг/мл пірувату натрію і 0,1 мг/мл глутаміну і $3 - 5 \times 10^6$ клітин гранулози на мл, які вилучали із неатретичних фолікулів.

Дозрілі *in vitro* яйцеклітини корів осіменяли кріоконсервованими еякульованими сперматозоїдами бугаїв-плідників. Капацитовані поза організмом сперматозоїди бугаїв та ооцити корів спільно інкубували в середовищі TALP-IVF з додаванням суміші ПГЕ (20 мкМ пеніциламіну (Sigma), 10 мкМ гіпотаурину (Sigma) та 1 мкМ епінефрину (Sigma) протягом 18 год. з концентрацією рухливих сперматозоїдів $1,5 - 2,0 \times 10^6$ сперматозоїдів/мл та температурі 38,5°C і 5 % CO₂ в атмосфері повітря і pH 7,8. Ембріони великої рогатої худоби культивували в середовищі 199 на розчині Ерла з 10 % фетальної сироватки теляти.

Рівень дозрівання ооцитів *in vitro*, запліднення та аналіз стану хроматину ядер ембріонів виявляли шляхом оцінки сухоповітряних препаратів, які готували за допомогою модифікованого методу А. Тарковського (Tarkowski A.K., 1966). Препарати фарбували з використанням 2%-го розчину барвника Гімза і аналізували їх під світловим мікроскопом Carl Zeiss із фотовиводом «Axiostar Plus».

Результати та обговорення

Вивчено вплив тривалості зберігання кріоконсервованих у рідкому азоті сперматозоїдів бугаїв-плідників на їх запліднювальну здатність в умовах *in vitro*. За результатами морфологічного аналізу встановлено, що рівень формування ембріонів із використанням для осіменіння яйцеклітин корів поза організмом еякульованих гамет трьох плідників є досить високим і цей рівень для бугая Гомер 200 перевищував 50 % (табл. 1). Встановлено, що найнижчу запліднювальну здатність проявили сперматозоїди бугая Трипле 244 і показник дроблення ембріонів *in vitro* був суттєво нижчим, порівняно із гаметами бугая Гомер 200.

Таблиця 1

Рівень формування *in vitro* ембріонів великої рогатої худоби

Гамети бугая-плідника	Кількість осіменених ооцитів, шт.	Рівень дроблення ембріонів <i>in vitro</i> , n (%)
-----------------------	-----------------------------------	--

Трипле 244	59	19 ^a (32,2 ± 6,08)
Гомер 200	49	26 ^b (53,1 ± 7,13)
Делец 185	74	32 ^a (43,2 ± 5,76)

a:b – $p < 0,05$, критерій χ^2 . Різні суперскрипти у межах однієї колонки вказують на вірогідну різницю між показниками.

Результати морфологічного аналізу з одержання ембріонів *in vitro* з метою перевірки запліднювальної здатності сперматозоїдів бугаїв необхідно доповнювати цитогенетичним аналізом яйцеклітин, з яких не відбулося формування зародків. Тобто після 24 годин культивування передбачуваних зигот поза організмом певний відсоток запліднених яйцеклітин не долає блоку дроблення для переходу до розвитку ембріонів. Але показник формування у запліднених яйцеклітинах пронуклеусів підвищує достовірність оцінки запліднювальної здатності гамет самця.

Нами встановлено на основі цитогенетичного аналізу нероздроблених яйцеклітин, що суттєво вищу запліднювальну здатність проявляють сперматозоїди бугая Гомер 200, порівняно із плідником Трипле 244 (табл. 2). З використанням гамет бугая Делец 185 виявлено дещо знижений відсоток заплідненості яйцеклітин (68,3 %) хоча суттєвої різниці не виявлено, порівняно із Гомером 200, але цей показник суттєво перевищував бугая Трипле 244 ($p < 0,01$).

Таблиця 2

Цитогенетичний аналіз рівня запліднювальної здатності сперматозоїдів плідників

Гамети бугая-плідника	Кількість проаналізованих ооцитів, шт.	Рівень дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> , n (%)	Рівень запліднення ооцитів <i>in vitro</i> , n (%)
Трипле 244	59	47 ^a (79,7 ± 5,24)	23 ^b (39,0 ± 6,35)
Гомер 200	38	35 ^a (92,1 ± 4,38)	27 ^c (71,1 ± 7,35)
Делец 185	41	39 ^a (95,1 ± 3,37)	28 ^c (68,3 ± 7,27)

b:c – $p < 0,01$, критерій χ^2 .

Умови дозрівання ооцитів корів поза організмом підібрані нами так, щоб забезпечити відсутність різниці у рівні досягнення ними стадії метафази II мейозу. Це дозволяє вірогідно оцінити рівень запліднювальної здатності сперматозоїдів плідників за результатами формування ембріонів *in vitro*.

Висновки

Таким чином, одержання та культивування *in vitro* ембріонів великої рогатої худоби можна успішно застосовувати для перевірки запліднювальної здатності сперматозоїдів плідників. За рівнем заплідненості ооцитів корів поза організмом, розвитком зародків необхідно перевіряти якість гамет бугаїв-плідників, сперма яких зберігається тривалий час у замороженому вигляді.

Література

1. Искусственное осеменение сельскохозяйственных животных / [Ожин В.Ф., Родин И.И., Румянцев Н.В. и др.]. – М. : – 1961. – С. 5–24.
2. *Наук В. А.* Длительное сохранение спермы животных в глубокомороженном состоянии / В. А. Наук, Н. Н. Ротт // Сперматогенез и его регуляция. – М. : Наука, 1983. – С. 161–193.
3. *Ефименко М. Я.* Оценка фертильности быков методом оплодотворения *in vitro* / М. Я. Ефименко, С. И. Ковтун, Н. Я. Мелешко [и др.] // Научное наследие П.Н. Кулешова и современное развитие зоотехнической науки и практики животноводства : сб. материалов Междунар. науч.-практ. конф. – М., 2006. – С. 152–155.
4. *Зубець М. В.* Сучасний стан та перспективи генетично – селекційного і біотехнологічного моніторингу в тваринництві України / М. В. Зубець, В. П. Буркат,

- М. Я. Єфіменко [та ін.] // Вісн. Сумського нац. аграр. ун-ту. – 2002. – Вип. 6. – С. 3–12.
5. Сураєва Н. М. Оптимальные приемы капацитации спермы быков для оплодотворения яйцеклеток / Н. М. Сураєва, А. З. Кесян, М. И. Прокофьев // Вестник акад. с.-х. наук. – 1993. – № 4. – С. 49–50.
 6. Prather R. S. Nuclear transplanted as a method for cloning embryos / R. S. Prather // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. – 1990. – № 195, 1. – P. 7–12.
 7. Production of chimaeric mice derived from embryonic stem cells with the neomycin phosphotransferase gene introduced by electroporation / T. Tokunaga, T. Furasawa, M. Okazaki [et al.] // J. Reprod. Devel. – 1992. – № 38, 5. – P. 27–32.
 8. Trish B. Modification of the zona – free hamster ova bioassay of boar sperm fertility and correlation with *in vivo* fertility / B. Trish, P. Kent // Gamete Res. – 1989. – № 22, 4. – P. 385–397.
 9. Харенко М. І. Біотехнологія розмноження свиней / М. І. Харенко, М. В. Черненко. – К. : „Ветінформ”, 1996. – 216 с.
 10. Assesment of bull sperm fertilizing ability / H. Rodriguez–Martinez, B. Larsson, B. R. Zhang [et al.] // Reprod. Dom. Anim. – 1996. – № 31. – P. 515–517.
 11. Кузнєцов В.С. Біотехнологія у тваринництві // Генетика і селекція в Україні на межі тисячоліть / ред. кол. : В. В. Моргун (гол. ред.) [та ін.]. – К. : Логос, 2001. – Т. 4. – С. 31–57.
 12. Penetration by bull spermatozoa into the zone pellucida of dead bovine oocytes recovered from frozen – thawed ovaries / H. Tatemoto, T. Horiuchi, T. Maeda [et al.] // Theriogenology. – 1994. – № 42. – P. 465–474.

Резюме

Обсуждается эффективность использования метода получения *in vitro* эмбрионов крупного рогатого скота для достоверной оценки оплодотворяющей способности гамет быков-производителей, сперма коротых используется для сохранения генофонда

It is discussed effects of using method production bovine embryo *in vitro* for reliable evaluation of impregnating ability bull spermatozoa, which semen gene poll preservation

КОЛОДЯЖНАЯ Я.С.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, 630090. Новосибирск, пр. аврентьева, 10

Université Libre de Bruxelles, Bd. du Triomphe, CP242, Bruxelles, 1050, Belgique

e-mail: jsk@ngs.ru

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ МЕТАЛЛОТИОНЕИНОВ В ОБЕСПЕЧЕНИИ УСТОЙЧИВОСТИ К ТОКСИЧЕСКОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

В связи с антропогенным воздействием возрастает загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами, в число которых входят ртуть, кадмий, свинец, цинк, медь и некоторые другие. Благодаря наличию механизмов устойчивости, действующих на разных уровнях организации, некоторые виды растений способны расти и развиваться без серьезных нарушений физиологических процессов в присутствии довольно высоких концентраций металлов в окружающей среде. В настоящее время идентифицировано свыше 450 видов растений в 34 семействах (0,2 % составляют покрытосемянные растения), способных накапливать такие металлы как цинк, никель, марганец, медь, кобальт, кадмий (Verbruggen, 2009). При этом большинство из них аккумулируют именно никель. В частности, существуют такие гипераккумуляторы