

ПІДВИЩЕННЯ РІВНЯ ЗАПЛІДНЕНОСТІ КОРІВ ТА ОДЕРЖАННЯ ТЕЛЯТ ВИЗНАЧЕНОЇ СТАТІ ШЛЯХОМ ОСІМЕНІННЯ ЇХ СОРТОВАНОЮ СПЕРМОЮ БУГАЇВ

І. М. Михайлицька, А. В. Мадіч

Обґрунтовано метод підвищення ефективності осіменінням корів і телиць спермою елітних бугаїв розділеної на фракції спермійів з X- та Y-домінуючими хромосомами. Представлено дані про якість сортованої сперми, її запліднювальну здатність при ректоцервікальному способі осіменіння корів та про кількість народжених телят заздалегідь визначеної статі.

Штучне осіменіння корів спермою, розділеною на фракції спермійів з X та Y-домінуючими хромосомами — новий біотехнологічний метод у тваринництві. Цей метод дає можливість одержувати приплід визначеної статі. Засвоєння нами методу розділення спермійів бугаїв-плідників голштинської породи англійської селекції в лабораторії біотехнології в Інституті здоров'я тварин (Великобританія) на сортері Hoechst 3332, дозволило використовувати розморожену сортовану сперму при осіменінні корів у ряді консалтингових господарств Уельсу.

Потенціал продуктивності у молочному та м'ясному скотарстві значною мірою залежить від генотипу плідника. Тому селекціонери постійно підвищують вимоги до бугаїв-виробників сперми. Щороку у Великобританії проводять селекцію 400 бугаїв голштинської породи, яких підбирають у 6-місячному віці. Із найкращих 16-ти плідників, оцінених за якістю нащадків, для відтворення залишають одного, вартість якого може сягати півмільйона фунтів стерлінгів. Для добору тварин за стандартами типу й параметрами продуктивності створено розгалужену мережу незалежних державних бонітерів і експертів породних асоціацій, завданням яких є допомога сучасному фермерові в поліпшенні власного поголів'я. Найкращу сперму для запліднення корів можна придбати у великих селекційних племінних центрах та об'єднаннях, що утримують бугаїв-плідників і мають сортовану сперму від них.

Бугаї проходять оцінку за продуктивністю дочок. Якщо бугай призначений на імпорт, цю оцінку проводять на його батьківщині. Така сперма досить дорога. Бажаним є імунологічне підтвердження походження плідника, про що свідчить відповідний сертифікат, виданий племінною асоціацією [2].

Бугаїв оцінюють у господарстві за такими ознаками: легкість народження телят від запліднених корів, кількість народжених телиць та тривалість їх використання, молочна продуктивність дочок та вміст жиру і протеїну в молоці, кількість у ньому соматичних та мікробних клітин, статура тіла одержаних телиць, вгодованість, кутність тазу, постава передніх ніг, постава задніх ніг, кут ребер, кут копит, глибина та величина молочної залози, роздільність їх частин, розміщення дійок, їх довжина і ширина, швидкість молоковіддачі. Загальний спермобанк у бугаїв-плідників становить 50–200 тис. доз і більше. Банк селекційних даних включає такі дані: відомості про матерів бугаїв з урахуванням даних про продуктивну і племінну цінність корів та їхніх предків; відомості про бугаїв-плідників, а саме дані про корисні ознаки бугаїв та їх предків; відомості про дочок бугаїв; селекційно-генетичні, зоотехнічні й економічні параметри, які характеризують породну популяцію.

Висока вартість обладнання для сортування сперми, а також відсутність спеціально підготовленого персоналу, здатного забезпечити роботу сортера стримує поширення цього біотехнологічного напрямку осіменіння в Україні. Недостатнє забезпечення вітчизняних науково-дослідних інститутів сучасною апаратурою і висока вартість молекулярно-біологічних досліджень стримують розвиток вітчизняного розведення великої рогатої худоби шляхом осіменіння їх сортованою спермою.

Метою даної роботи було дослідити запліднювальну здатність сперми елітних бугаїв–виробників, які використовуються на фермах Уельсу, після розділення її на фракції спермій з X- і Y-домінуючими хромосомами та заморожування.

Матеріали і методи. Дослідження виконані в рамках загальної наукової програми Інституту здоров'я тварин (Великобританія), інвестовані кампанією Genus Breeding Ltd. Опрацювання методу сортування сперми проводили в лабораторії біотехнології Інституту здоров'я тварин. Запліднювальну здатність сортованої розмороженої сперми досліджували в двох консалтингових господарствах «Herescombe farm» та «Loyds farm» графства Глостер на 225 коровах і 50 телицях голштинофризької породи парувального віку. Високопродуктивні корови, аналоги за рівнем продуктивності, утримувались безприв'язно. Вони отримували однаковий основний раціон, мали вільний доступ до корму, солі та води. Основний раціон складався з: 3,66 % м'яси, 15,41 % преміксу, 1,93 % сіна, 34,68 % силосу трав'яного, 44,32 % силосу кукурудзяного. Премікс містив: 25 % ріпаку, 25 % сої, 12,5 % жому, 1,87 % мінеральних речовин, 3,58 % вітамінів. Кожна корова отримувала 56–60 кг основного раціону на добу.

Згідно з розробленою схемою досліджень було сформовано 4 групи тварин. Тварини були клінічно здоровими і не мали жодних ознак статевих захворювань. До першої дослідної групи (n=75) увійшли корови, яких запліднювали сортованою спермою з домінуючою хромосомою X. Другу дослідну групу (n=75) склали корови, яких запліднювали сортованою спермою з домінуючою хромосомою Y. Третю дослідну групу (n=50) склали телиці, яких запліднювали сортованою спермою з домінуючою хромосомою X (оскільки попит на телиць переважаючий, фракції сперми з Y-хромосомою зазвичай використовуються менш інтенсивно в господарствах молочного напрямку). Корів контрольної групи (n=75) підбирали рендемічно (методом вільної виборки).

Для проведення досліджень використовували сортовану сперму від бугая-плідника голштинофризької породи англійської селекції Чемпіон. Перед штучним осіменінням соломинки об'ємом 0,1 мл відтаювали в електронному термобоксі для розморожування сперми у водяній бані при температурі 38 °C. Співвідношення нормальних і патологічних форм спермій визначали за допомогою мікроскопа та системи контролю якості сперми (комп'ютер та апарат medeaLAB CASA), об'єднаної під спільною назвою CASA-system (Computer Aided Semen Analysis). Робота CASA-системи ґрунтується на попередній обробці телевізійного сигналу для визначення кінетичних і морфологічних характеристик спермій. Якість розмороженої сперми оцінювали за активністю, прямолінійно поступальним рухом та виживаністю.

Штучне осіменіння корів і телиць проводили внутрішньоматково з фіксацією шийки через пряму кишку та введенням катетера з сортованою спермою в дозі 0,1 мл у ріг матки, де яєчник містить зрілий фолікул. Ефективність запліднення визначали на 35-й день після штучного осіменіння корів і телиць методом ультразвукової діагностики матки та яєчників ректально. Заплідненість визначали за відсотком тільних від загальної кількості первинно осіменених корів. Визначення статі плоду та аномалій розвитку проводили після народження телят методом ветеринарного обстеження.

Результати та обговорення. Аналіз якості еякуляту проводили методом мікроскопії шляхом визначення концентрації, активності та прямолінійно поступального руху спермій. Важливою характеристикою чоловічих гамет є їх кінетичні особливості. Так, наприклад, при олігоспермії різного ступеня різко знижується кількість рухливих спермій і змінюються параметри їх руху. Автоматизація процесу лабораторних мікроскопічних досліджень сперми значно спрощує роботу персоналу. Застосування оптико-електронних засобів для дослідження якості сперми дозволяє за рахунок підвищення точності виміру кінетичних і морфологічних характеристик спермій підвищити на 25–30 % запліднюючу здатність.

Застосування системи контролю якості сперми CASA дозволяє провести об'єктивне порівняння кінетичних і морфологічних характеристик сортованих і несортованих спермій (табл. 1). Встановлено, що відсоток живих спермій у сортованій спермі був достовірно вищим і становив 87,6 % проти 73,7 % у несортованій спермі. Патологічних

форм, навпаки, серед сортованих сперміїв було менше — 0,7 % проти 10,1 %. Виробничі характеристики застосованого для фракціонування сперми сортера Hoeschst 3332 забезпечували одночасне вимірювання деяких параметрів сперміїв, а саме оцінку їх морфометричних особливостей та кінетичних властивостей зі швидкістю 10 000 гамет за секунду. Застосування методу струменевої цитометрії дозволило отримати сперму, яка на 97–99 % складалася зі сперміїв високої запліднювальної здатності, що забезпечує народження телят заздалегідь визначеної статі у 95–98 % випадках [8]. У процесі сортування сперми зазвичай отримують 3 фракції, одна з яких — це мертві спермії, або гамети з тими чи іншими порушеннями в морфології чи кінетиці. Однак процеси заморожування-розморожування сперми, не дивлячись на високоякісні кріопротектори та вітріфікаційні технології, все ж таки знижують загальну характеристику сперміїв, що відобразилась на їх життєздатності. Найбільше це стосується несортованої сперми.

З наведених у таблиці 1 даних видно, що при заморожуванні і розморожуванні сортованої сперми певна кількість сперміїв все ж таки загинула, що знизило кількість живих і рухливих гамет до 87,6 %.

Таблиця 1

Оцінка якості сперми сортованої та несортованої за системою CASA

Показники	Сперма сортована	Сперма несортована
Живі спермії, %	87,6	73,7
Спермії з патологічними відхиленнями, всього, %	0,7	10,1
Спермії з патологіями головки, тіла і хвостика, %	0,1	4,1
Спермії з пошкодженнями акросомної головки, %	0,6	6,0
Активність сперміїв за системою CASA, 5-бальна шкала	4,7	4,0
Рухливість сперміїв за системою CASA, %	97	88
Амплітуда коливання акросомної головки сперміїв, 10-бальна шкала	6,6	5,9
Прямолінійність руху сперміїв, %	51,5	53

Отже, сортована сперма мала кращі якісні показники, а ніж несортована.

З метою ефективного використання сперми бугаїв і підвищення заплідненості самок ми використовували внутрішньоматковий спосіб штучного осіменіння корів і телиць. При даному способі осіменіння сортованою спермою в кількості 0,1 мл з прямолінійно поступальним рухом можна досягти високої запліднювальної здатності тварин після першого осіменіння. Якщо ж знехтувати глибиною введення сперми, то це призведе до негативних наслідків: частка корів може залишитись незаплідненою, особливо, якщо під час осіменіння у них була гіпотонія матки. За цих умов, якщо сперма введена в шийку матки, переважна більшість сперміїв виходить із слизом де фагоцитується, внаслідок чого певна кількість сперміїв не здатна до акросомної реакції, як наслідок не забезпечує повне розрідження прозорої оболонки яйцеклітини.

Запліднюваність корів від першого осіменіння сортованою і замороженою спермою була на 20 % вища ніж корів, осіменених спермою замороженою несортованою (табл. 2). Це пояснюється тим, що несортована сперма містить малорухливі та слабкі спермії, а також спермії з різними патологічними формами, що значно зменшує відсоток запліднених корів. Запліднюваність корів контрольної групи несортованою спермою становила 66,67 %, а фракціонованою спермою з X-домінуючою хромосомою — 82,66 %, з Y-хромосомою — 86,66 %. При заплідненні телиць сортованою спермою тільність становить 96,0 %. Зазвичай, осіменіння добре розвинутих, помірно вгодованих телиць підвищує їх заплідненість після першого осіменіння, а в корів старшого віку репродуктивна функція слабшає, зростає кількість повторних осіменінь [3].

Таблиця 2

Ефективність осіменіння корів

Групи	Характеристика	Кількість	Запліднюваність корів, n — %	Всього	Народилося телят, n — %
-------	----------------	-----------	------------------------------	--------	-------------------------

тварин	груп	тварин у групі	1-ше осіменіння	2-ге осіменіння	3-тє осіменіння	Голів	Заздалегідь визначеної статі	З аномаліями розвитку
Дослідна 1	Корови, запліднені спермою з домінуючою Х-хромосомою	75	62 82,66 %	10 13,34 %	3 4,0 %	75 100 %	68 90,66 %	1 1,34 %
Дослідна 2	Корови, запліднені спермою з домінуючою Y - хромосомою	75	65 86,66 %	9 12,0 %	1 1,34 %	75 100 %	71 94,66 %	2 2,66 %
Дослідна 3	Телиці, запліднені спермою з домінуючою Х - хромосомою	50	48 96,0 %	2 4,0 %	–	50 100 %	46 92,0 %	–
Контрольна	Корови, запліднені несортованою спермою	75	50 66,67 %	18 24,0 %	7 9,33 %	75 100 %	49 65,33 % бичків 26 34,66% телиць	7 9,33 %

Кількість здорових телят, одержаних від першого осіменіння в дослідних групах корів була вищою, ніж у контролі, а відсоток народжених телят з різними аномаліями в дослідних групах був нижчий, ніж у корів контрольної групи.

Завдяки сортуванню сперми у корів дослідних груп народилося менше телят з аномаліями розвитку (від 1 % до 3 %) у порівнянні з контролем (9,33 %). З представлених у таблиці 2 даних видно, що при осіменінні корів несортованою спермою народжується більша кількість телят чоловічої статі (65 %), що є економічно не вигідним для молочного скотарства. Більшість господарств Великобританії забивають бичків молочної породи у віці 3–5 днів, а теличок вирощують для відновлення стада.

Результати наших досліджень і аналіз наявної літератури дозволяє зробити висновок, що стан відтворення великої рогатої худоби можна суттєво поліпшити шляхом осіменіння корів сортованою спермою, що підвищує їх заплідненість і забезпечує одержання телят потрібної статі.

В И С Н О В К И

1. Обґрунтовано метод підвищення ефективності штучного осіменіння корів і телиць шляхом використання сперми сортованої на фракції з Х- та Y-домінуючими хромосомами, що підвищує вихід телят, знижує витрати спермодоз на плідне осіменіння та забезпечує одержання тварин високоцінних генотипів.

2. Використання якісної сортованої спермопродукції бугаїв забезпечує народжування телят заздалегідь визначеної статі, забезпечує високий рівень запліднюваності корів при першому осіменінні.

INCREASING THE FECUNDITY LEVEL OF COWS AND RECEIVING THE CALVES WITH DETERMINED SEX AFTER ARTIFICIAL INSEMINATION BY SORTED SPERM

I. M. Mykhaylytska, A. V. Madich

S U M M A R Y

The method of ejaculate separation to sperm cells fractions with X- and Y-dominated chromosomes, which increases the fecundity level of cows and heifers, was described. Separation of

X- and Y-chromosome bearing sperm cells and artificial insemination by sexed semen can be used for receiving the calves with pre-determined sex. The method gives possibility to considerably improve fertility and cattle breeding, genetic resource management also improves the quality of sperm.

ЛІТЕРАТУРА

1. Безуглий М. Д., Гузеватий О. Є. Розвиток біотехнології відтворення сільсько-господарських тварин // Вісник аграрної науки. — 2006. — N 12. — С. 83–86.
2. Мадісон В., Мадісон Л. На допомогу “новому” тваринникові // Вісник аграрної науки. — 2003. — N 68. — С. 10.
3. Сірацький Й., Демчук С., Федорович І., Шарапа Г. Пошуки резервів відтворення ВРХ: здобутки і перспективи // Вісник аграрної науки, — 2001. — № 2. — С. 3–8.
4. Шарапа Г. Раціональне використання бугаїв // Вісник аграрної науки. — 2003. — N 29 — С. 5–6.
5. Checa M. L., Dunner S., Cañón J. Prediction of X and Y chromosome content in bovine sperm by using DNA pools through capillary electrophoresis // Theriogenology. — 2002. — N 58(8). — P. 1579–1586.
6. de Graaf S. P., Evans G., Maxwell W. M., Cran D. G., O'Brien J. K. Birth of offspring of pre-determined sex after artificial insemination of frozen-thawed, sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa // Theriogenology. — 2007. — N 2. — P. 391–398.
7. Habermann F. A., Winter A., Olsaker I., Reichert P., Fries R. Validation of sperm sexing in the cattle (*Bos taurus*) by dual colour fluorescence in situ hybridization // Anim. Breed. Genet. — 2005. — Apr; 122. — Suppl 1. — P. 22–27.
8. Mocé E., Graham J. K., Schenk J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction // Theriogenology. — 2006. — N 4. — P. 929–936.