

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ООЦИТ-КУМУЛУСНЫХ КОМПЛЕКСОВ *Bos taurus* И *Bos indicus* РАЗНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ПРОДУКТИВНОСТИ.

Л.Н. Ротарь,¹ аспирант, J.F. Souza²

¹Санкт-Петербургский государственный аграрный университет,
196601, Санкт-Петербург, Пушкин, Петербургское шоссе, 2

²Labor Brio embryo Assessoria Agropecuaria e Biotecnologia Ltda, Araguaína-TO,
rua Ademar Vicente Ferreira, n. 2241, setor Senador, Brazil
E-mail: valevskaya@bk.ru

В технологии прижизненного получения эмбрионов коров in vitro качественные и количественные показатели исходной популяции жизнеспособных ооцитов определяют успешный выход бластоцист, пригодных для последующего нативного эмбриотрансфера или криоконсервации. Поэтому изучение репродуктивного потенциала коров Bos taurus и Bos indicus (зебувидный скот) разного направления продуктивности методом оценки качества и количества ооцитов представляет научный и практический интерес. Цель исследования – проведение сравнительного анализа российского и бразильского скота по показателю выхода ооцит-кумулясных комплексов (ОКК) и их морфологическим характеристикам в популяциях крупного рогатого скота молочного и мясного направления продуктивности. Были сформированы следующие группы коров: абердин-ангусская порода (n=82); черно-пестрая порода (n=62); Nelore (n=149); Gir (n=63). Материалом исследования были ооцит-кумулясные комплексы, полученные в результате трансвагинальной пункции фолликулов. Качество ОКК оценивали по следующим показателям: наличие слоев кумулюса и его качество, размер ооцита, однородность и цвет ооплазмы, тургор. Количество жизнеспособных ОКК от общего количества составляет: абердин-ангусы – 67,2%; черно-пестрые – 42, Nelore – 83,9; Gir – 71,4. Сделан вывод о том, что Bos indicus (зебувидный скот) является перспективным для технологии производства эмбрионов in vitro, так как превосходит Bos taurus более чем в 2 раза по выходу ооцитов.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE OOCYTE-CUMULUS COMPLEXES *BOS TAURUS* AND *BOS INDICUS* OF DIFFERENT PURPOSE PRODUCTIVITY

Rotar L.N.¹, Souza J.F.²

¹Saint-Petersburg State Agrarian University, 19660, 1 Sankt-Peterburg,
Pushkin, Peterburgskoe sh., 2

²Labor Brio embryo Assessoria Agropecuaria e Biotecnologia Ltda, Araguaína-TO, rua Ademar Vicente Ferreira, n. 2241, setor Senador, Brazil
E-mail: valevskaya@bk.ru

In the technology of in vitro embryo production in bovines, qualitative and quantitative indicators of the initial population of viable oocytes determine the successful output of blastocysts suitable for native embryotransfer or vitrification. Therefore the study of reproductive potential of cows Bos taurus and Bos indicus (zebu cattle) of different directions of productivity by the method of assessing the quality and quantity of oocytes is of scientific and practical interest. The aim of this study was to conduct a comparative analysis of Russian and Brazilian cattle on the yield of oocyte-cumulus complexes (OCC) and their morphological characteristics in the populations of dairy and beef cattle productivity. The following samples of cows were formed: Aberdeen-Angus breed n=82 (Russian Federation); black-and-white breed n=62 (Russian Federation); Nelore n=149 (Brazil); Gir n=63 (Brazil). The material of the study was oocyte-cumulus complexes obtained in the result of transvaginal puncture of follicles (transvaginal aspiration of oocytes TAO, ovum pick-up OPU). The quality of OCC was assessed by the following morphological parameters: the presence of cumulus layer and its quality, oocytes size, homogeneity and color of ooplasm, turgor. The number of viable OCC from the total amount is: Aberdeen Angus 67.15%; black-mottled 42%; Nelore 83.9%; Gir 71.4%. Thus, Bos indicus (zebu cattle) is more promising for the technology of production embryos in vitro, as it exceeds Bos taurus by more than 2 times in the output of oocytes, both in the group of beef cattle and in the group of dairy.

Ключевые слова: морфология ооцитов коров, трансвагинальная аспирация, *Bos taurus*, *Bos indicus*

Key words: morphology of bovine oocyte, transvaginal aspiration, *Bos taurus*, *Bos indicus*

Внедрение эмбриотехнологий в практику мирового животноводства способствует повышению эффективности племенной работы с использованием вспомогательных репродуктивных технологий. Актуальной задачей является селективный отбор коров-доноров, которые должны соответствовать следующим критериям: племенная ценность, высокая продуктивность, конституция, способность к воспроизводству и передаче ценного генотипа максимальному количеству эмбрионов. Прижизненное получение и трансплантация эмбрионов крупного рогатого скота рассматривается как эффективный метод биотехнологии ускоренного размножения высокопродуктивных самок [1]. Существует два основных эффективных метода получения эмбрионов при жизни животного – *in vivo* (стимуляция суперовуляции, осеменение, вымывание эмбрионов из рогов матки), *in vitro* (трансвагинальная аспирация ооцитов, с последующим дозреванием, оплодотворением и культивированием эмбрионов до стадии бластоцисты) [2–4]. В технологии получения эмбрионов *in vitro* качественные и количественные показатели исход-

ной популяции жизнеспособных ооцитов определяют успешный выход бластоцист, пригодных для последующего нативного эмбриотрансфера или витрификации [5]. Качество и количество ооцитов, выделяемых из яичников коров, различно в зависимости от породной принадлежности [6]. Все породы происходят от безрогого (*Bos taurus taurus*) и горбатого (*Bos taurus indicus*) скота. Геномы этих подвидов имеют различия в митохондриальной ДНК и Y хромосоме. Породы, произошедшие от *Bos taurus taurus*, лучше приспособлены к умеренному и холодному климату, а от *Bos taurus indicus* — к жаре [7]. Анализ полиморфизма полилокусных спектров ISSR-маркеров привел к выделению групп фрагментов, которые могут использоваться для маркирования видов *Bos taurus* и *Bos indicus* [8]. По результатам исследований метаболических и эндокринных процессов установлено, что у коров породы Nelore большее количество антральных фолликулов, чем аналогичный параметр у коров голштинской породы [9]. Установлена взаимосвязь между морфологией ооцит-кумулясных комплексов, выделенных из антральных

фолликулов, и их потенциалом к дальнейшему развитию [10]. Голштинские телки по отношению к телкам Gir имели меньше фолликулярных волн в эстральном цикле, меньшую численность когорты антральных фолликулов, но больший диаметр доминантных и овуляторных фолликулов [11]. Таким образом, было выявлено, что даже при сходных экологических параметрах и условиях кормления имеются существенные различия в физиологии яичников и в гормональном статусе между *Bos indicus* и *Bos taurus*. Данные согласуются во многих исследованиях и показывают, что более многочисленная когорта антральных фолликулов у зебровидного скота [12–14]. Это может быть связано с более высокой концентрацией инсулина и инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1) у *Bos indicus* и с метаболизмом стероидных гормонов [15]. Характерные различия между *Bos taurus* и *Bos indicus* могут оказывать влияние на результативность репродуктивных биотехнологий, таких как получение эмбрионов *in vitro* (IVEP *in vitro* embryo production). В исследованиях Sales et al. [16] самкам крупного рогатого скота, содержащимся при одинаковых условиях окружающей среды и производственного менеджмента, была проведена трансвагинальная аспирация ооцитов. Независимо от дня выполнения пункции фолликулов коровы голштинской породы имели 57,7 % жизнеспособных яйцеклеток, а Nelore – 68,8%. Поэтому изучение репродуктивного потенциала коров *Bos taurus* и *Bos indicus* молочного и мясного направления продуктивности методом оценки качества и количества ооцит–кумулюсных комплексов, представляет научный и практический интерес.

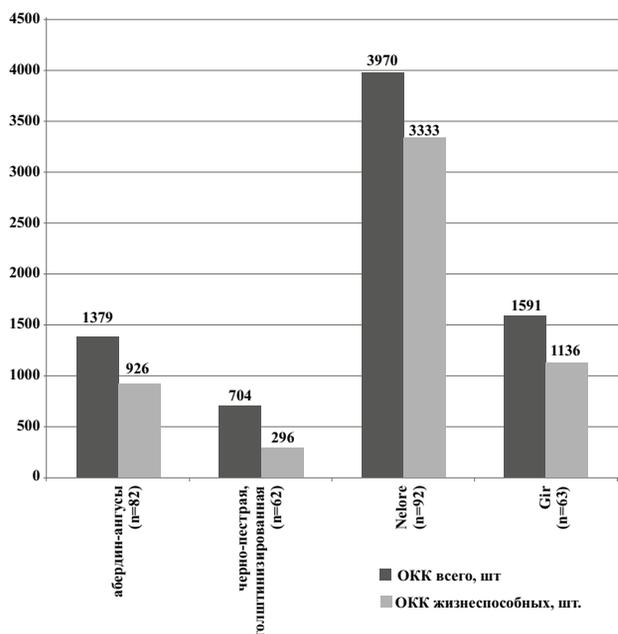
Цель исследования – провести сравнительный анализ российского и бразильского скота по показателю выхода ОКК и их морфологическим характеристикам в популяциях различного направления продуктивности.

Методика. Были сформированы следующие группы коров: 1 – абердин-ангусская порода (n=82), 2 – черно-пестрая голштинизированная порода (n=62), 3 – Nelore (n=149), 4 – Gir (n=63). Процедуры забора ооцитов проводили с декабря 2017 по февраль 2018 г. Материалом исследования служили ооцит-кумулюсные комплексы, полученные в результате трансвагинальной пункции фолликулов (трансвагинальная аспирация ооцитов ТАО, ovum pick-up technology OPU), которую осуществляли с использованием ультразвукового сканера, ультразвукового излучателя с частотой 7,5 MHz, вакуумной помпы, пункционной насадки, иглы диаметром 18G. Давление в аспирационной системе при заборе ооцитов не превышало 50 мм рт.ст. В качестве промывной жидкости использовали фосфатно-солевой буфер Дюльбекко с добавлением 100 ед/мл гентамицина и 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA). Локализацию ооцит-кумулюсных комплексов проводили с помощью сетчатого фильтра, визуализацию и оценку качества полученных ооцитов – с использованием стереоскопического микроскопа при 28 и 90-кратном увеличении. Качество ооцит-кумулюсных комплексов оценивали по следующим параметрам: наличие слоек кумулюса и его качество, размер ооцита, гомогенность и цвет ооплазмы, тургор. ОКК высшего качества имели более трех слоев компактного кумулюса, гомогенную серую ооплазму и хороший тургор, хорошего качества – 2–3 слоя кумулюса, гомогенную ооплазму и хороший тургор; удовлетворительного качества – 1 слой кумулюса или его фрагменты, в ооплазме допустимы участки с более выраженной пигментацией, нормальный тургор. Размер ооцитов, отобранных для дальнейшего культивирования, варьировал в пределах

110–120 мкм. Ооциты без кумулюса (денудированные) или имеющие кумулюс с признаками дегенерации, неоднородную черную ооплазму, а также ооциты с прозрачной ооплазмой были определены как нежизнеспособные.

Для сравнения результатов, полученных в исследуемых группах, использовали критерий Стьюдента. Расчет проведен с помощью статистической программы Atte Stat.

Результаты и обсуждение. Данные диаграммы, представленные на рисунке, характеризуют популяцию ооцит–кумулюсных комплексов в разных группах самок–доноров. В зависимости от породы, количество жизнеспособных ОКК от их общего числа составляет: абердин–ангусы – 67,2%, черно–пестрые голштинизированные – 42, Nelore – 83,9; Gir – 71,4.



Характеристика популяции ооцитов *Bos taurus* и *Bos indicus*.

Выход ооцитов на голову, полученных от коров–доноров.

Группа	<i>Bos taurus</i>		<i>Bos indicus</i>	
	абердин-ангус	черно-пестрая голштинизированная	nelore	gir
Направление продуктивности	Мясное	Молочное	Мясное	Молочное
Возраст, мес	24–72	27–60	24–60	27–60
п, голов	82	62	92	63
ОКК всего (среднее донора), шт.	16,8±0,8*	11,3±1,1*	43,1±3,6*	25,3±2,1*
ОКК жизнеспособных (среднее на донора), шт.	11,3±0,6a	4,8±0,6c	36,2±2,1b	18,1±2,8d

Примечание: *P<0,05.

По данным таблицы, среднее значение ОКК на голову, полученное от коров голштинизированной чер-

но-пестрой породы, было меньше, чем в группе самок абердин-ангус и зебувидного скота. Относительное количество жизнеспособных ОКК на одного донора от общего количества в группе самок Nelore было наивысшим, а количество жизнеспособных ооцитов, полученных от коров мясного направления породы абердин-ангус, уступало им более чем в 3 раза. Выход жизнеспособных ОКК на одного донора в группе черно-пестрых коров оказалось на 13,3% меньше, чем на одну корову в группе Gir. Следует отметить, что выход жизнеспособных гамет в группах *Bos taurus* и *Bos indicus* у коров мясного направления продуктивности выше, чем у молочного скота.

Сравнение молочных пород *Bos taurus* и *Bos indicus* показало, что выход ооцитов у самок черно-пестрой голштинизированной породы более чем в 2 раза уступает коровам породы Gir и является наименьшим во всех 4 группах. Причиной этого может быть интенсивная селекция на повышение признаков молочной продуктивности в черно-пестрой породе, проводимая в последние десятилетия в РФ. Голштинизация черно-пестрого скота, разводимого в России, несомненно, позволила значительно повысить молочную продуктивность коров, но при этом происходит снижение фертильности, что приводит к ранней выбраковке животных [18,19].

У самок *Bos indicus* больше гамет, пригодных для производства эмбрионов [14, 20]. По данным исследователей (Sartori R. et al., 2016), от коров Nelore было получено значимо большее количество жизнеспособных ооцитов в сравнении с самками голштинской породы (68,8 и 57,7%) [13]. В целях увеличения выхода ооцитов некоторые авторы рекомендуют разведение кроссбредных коров голштинской породы с добавлением крови животных породы Gir [21].

Таким образом, зебувидный скот является более перспективным для технологии прижизненного получения эмбрионов *in vitro*, так как превосходит *Bos taurus* более чем в 2 раза по выходу ооцитов в группе как мясного, так и молочного скота.

Литература.

1. Кыса И.С. Ускоренное воспроизводство высокопродуктивных племенных животных в молочном и мясном скотоводстве на основе новых биотехнологических методов: Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. – Дубровицы, 2000.
2. Gordon I. *Laboratory production of cattle embryos: Монография.* – Dublin, 2003. – 548 p.
3. Пестис В.К., Голубец Л.В., Дешко А.С., Старовоитова М.П., Стецкевич Е.К., Кыса И.С., Якубец Ю.А., Попов М.В. Эффективность получения ооцитов методом трансвагинальной аспирации у коров-доноров // *Сельское хозяйство – проблемы и перспективы* Сб. науч. тр. под ред. чл.-корр. НАН Беларуси В. К. Пестиса. – Т. 26 ЗООТЕХНИЯ. – Гродно: ГАУ, 2014. – 123с.
4. Карымсаков Т.Н., Бекенов Д.М., Спанов А.А. Сравнительные результаты приживляемости сексированных эмбрионов, полученные методами *in vivo* и *in vitro* // *Молочное и мясное скотоводство.* – 2017. – № 6 – С. 9–11
5. Souza J.F., Oliveira C.M., Lienou L.L., Cavalcante T.V., Alexandrino E., Santos R.R., Rodrigues A.P.R., Campello C.C., Figueiredo J.R., Dias F.E.F. *Vitrification of bovine embryos followed by in vitro hatching and expansion*// *Zygote.* – 2018. – № 1 (26). – P. 99–103.
6. Ротарь Л.Н., Souza J.F. *Морфологическая оценка ооцит-кумулясных комплексов коров разного типа продуктивности в технологии получения эмбрионов in vitro*// *Качественный рост российского агропромышленного комплекса: возможности, проблемы и перспективы: Материалы деловой программы XXVII международной агропромышленной выставки «АГРОРУСЬ – 2018»* – СПб: СПбГАУ, 2018. – 318 с.
7. Ларкин Д.М., Юдин Н.С. *Значимость геномных исследований для понимания истории формирования домашних животных* // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* – 2016. – № 4. – С. 123–128.
8. Столповский Ю. А., Ахани Азари М., Евсюков А.Н., Кол Н.В., Рузина М.Н., Воронкова В.Н., Сулимова Г.Е. *Сравнительный анализ полиморфизма ISSR маркеров у пород крупного розатого скота* // *Генетика.* – 2011. – № 2 (47). – С. 213–226.
9. Bastos M.R., Mattos M.C.C., Meschiatti M.A.P., Surjus R.S., Guardieiro M.M., Ferreira J.C.P. *Ovarian function and circulating hormones in nonlactating Nelore versus Holstein cow s*// *Acta Scientiae Veterinariae.* – 2010. – № 38 (2). – 776 p.
10. Nagano M., Katagiri S., Takahashi Y. *Relationship between bovine oocyte morphology and in vitro developmental* // *Zygote.* – 2006. – № 14. – P.53–61.
11. Baldrighi J.M., Sa Filho M.F., Batista E.O.S., Lopes R.N.V.R., Visintin J.A., Baruselli P.S. *Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management*// *Reproduction In Domestic Animals.* – 2014. – № 49. – P. 1015–1020.
12. Alvarez P., Spicer L.J., Chase C.C., Payton M.E., Hamilton T.D., Stewart R.E. *Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment*// *Journal of Animal Science.* – 2000. – № 78. – P. 1291–1302.
13. Sartori R., Gimenes L.U., Monteiro P.L.J., Melo L.F., Baruselli P.S., Bastos M.R. *Metabolic and endocrine differences between Bos Taurus and Bos indicus females that impact the interaction of nutrition with reproduction*// *Theriogenology.* – 2016. – № 86. – P. 32–40.
14. Baruselli P.S., Batista E.O.S., Vieira L.M., Ferreira R.M., Guerreiro B.G., Bayeux B.M., Sales J.N.S., Souza A.H., Gimenes L.U. *Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages* *Animal Reproduction.* – 2016. – № 3 (13). – P.264–272.
15. Sartori R., Guardieiro M.M., Surjus R.S., Melo L.F., Prata A.B., Ishiguro M. *Metabolic hormones and reproductive function in cattle*// *Animal Reproduction.* – 2013. – № 10. – P.199–205.
16. Sales J.N.S., Iguma L.T., Batista R.I.T.P., Quintao C.C.R., Gama M.A.S., Freitas C. *Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in Bos indicus and Bos taurus cows*// *Journal of Dairy Science.* – 2015. – № 98. – P.3086–99.
17. Ward F.A., Lonergan P., Enright B.P., Boland M.P. *Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology*// *Theriogenology.* – 2000. – № 3 (54). – P. 433–446.
18. Hyun-Joo Lim, Ho-Beak Yoon, Harim Im, Jihoo Park, Yong-il Cho, Yeon-Seop Jeong, Kwang-Seok Ki, Seok-Ki Im. *Survey on the Incidence of Reproductive Disorders in Dairy Cattle* // *Journal of Embryo Transfer.* – 2015. – №1(30). – P.59–64.

19. Barbat A., Le Mezec P., Ducrocq V., Mattalia S., Fritz S., Boichard D., Ponsart C., Humblot P. Female fertility in French dairy breeds: current situation and strategies for improvement// *Journal of Reproduction and Development*.–2010.– № 56:– P. 15–21
20. Meza F.J.T., Souza J.F., Rosales J.H., Angel H.R., Rodríguez A.P., Lucero F.A.M., González A.R. De la congelación de semen y la inseminación artificial a la aspiración folicular y fecundación in vitro, 1a Reunion Regional sobre Reproduccion Asistida en bovines// *La biotecnología de la reproducción en rumiantes y su aplicación en la ganadería Mexicana, Torreon Coah, Mexico*.– 2018.
21. Pontes J.H.F., Silva K.C.F., Basso A.C., Rigo A.G., Ferreira C.R., Santos G.M.G., Sanches B.V., Porcionato J.P.F., Vieira P.H.S., Faifer F.S., Sterza F.A.M, Schenk J.L., Seneda M.M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm // *Theriogenology*.– 2010.– № 74 P. 1349–1355

Поступила в редакцию 13.11.18

После доработки 10.02.19

Принята к публикации 28.02.19