

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ РОЗВЕДЕННЯ І ГЕНЕТИКИ ТВАРИН
ІМЕНІ М.В.ЗУБЦЯ**

**МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ
ІЗ ЗАСТОСУВАННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ
ОЦІНКИ БІОМАТЕРІАЛУ
ЗА ТРИВАЛОГО ЙОГО ЗБЕРІГАННЯ**

Чубинське, 2018

Авторський колектив:

О. В. Щербак, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник;
С. І. Ковтун, доктор с.-г. наук, професор, академік НААН;
А. Б. Зюзюн, кандидат біологічних наук, ст. наук. співробітник;
П. А. Троцький, кандидат с.-г. наук, ст. наук. співробітник.

Рецензенти:

В. В. Дзіцюк, доктор с.-г. наук, завідувач лабораторії генетики Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН;

М. О. Малюк, доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України.

*Методичні рекомендації розглянуто і схвалено вченою радою
Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН
(протокол № 12 від 30.11.2018 року).*

В рекомендаціях узагальнено методичні підходи щодо застосування генетичної та біотехнологічної оцінки біоматеріалу за тривалого його зберігання. Ці методичні рекомендації забезпечують основу для розробки та впровадження комплексних підходів ембріогенетичного походження. Їх призначенням є визначення основних принципів розробки науково обґрунтованої програми системної оцінки кріоконсервованого матеріалу. Наведені способи оцінки ембріонів сірої української породи за молекулярно-генетичними методами. Розглянуті особливості використання біоматеріалу, який тривалий час зберігається в рідкому азоті. Дотримання принципів, наведених в даних рекомендаціях, сприятиме удосконаленню якості та узгодженості даних під час тривалого зберігання біоматеріалу тваринного походження.

Рекомендації розраховані на спеціалістів племпідприємств у галузі тваринництва, біотехнологічних і кріобіологічних лабораторій, науковців, викладачів і студентів вищих навчальних закладів біологічного й аграрного профілю.

Методичні рекомендації із застосування генетичної та біотехнологічної оцінки біоматеріалу за тривалого його зберігання / О. В. Щербак, С. І. Ковтун, А. Б. Зюзюн, П. А. Троцький. – Чубинське, 2018. – 24 с.

УДК 636.27(477):591.463.1:57.086.13

© Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН, 2018

ЗМІСТ

	Стор
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	4
ВСТУП.....	5
Підбір оптимальних методів для комплексного оцінювання кріоконсервованого генетичного матеріалу (сперматозоїди).....	6
Застосування методів ембріологічної генетики для оцінки життєздатності кріоконсервованих гамет.....	11
Молекулярно-генетична оцінка ембріонів сірої української породи за поліморфізмом гена тиреоглобуліну.....	12
Перспективи застосування генетичної та біотехнологічної оцінки біоматеріалу, який тривалий час зберігається.....	17
ДОДАТОК.....	18
СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	22

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

БСА	Bovine Serum Albumin (англ.), альбумін сироватки крові великої рогатої худоби
TG	тиреоглобулін
ПЛР	полімеразна ланцюгова реакція
ПДРФ	поліморфізм довжин рестриктних фрагментів
ЛГЖ- кріосередовище	лактозо-гліцерино-жовткове кріосередовище
ДП	державне підприємство
ДГ	дослідне господарство

ВСТУП

Завдяки впровадженню методу кріоконсервації сперми плідників, селекціонери наразі володіють різноманітним генетичним матеріалом у формі накопичених за багаторічний період породоутворення доз сперми від племінних тварин (І. В. Смірнов, 1983). Показано, що сперматозоїди після 10 років кріозберігання мають високі показники рухливості, виживаності та запліднювальної здатності (В. І. Волгіна, 1971; М. З. Басовський, 1973). Існує думка щодо можливості необмеженого терміну зберігання спермопродукції бугаїв за температури -196°C (умови рідкого азоту) без істотного зниження якісних характеристик за дотримання умов її зберігання (Ю. А. Столповский, 1997). Сперма сільськогосподарських тварин, яка зберігає повноцінність без суттєвого зменшення її біологічних показників упродовж 25 і більше років, набуває важливого значення в разі вирішення завдань щодо збереження локальних вітчизняних порід сільськогосподарських тварин (В. А. Коробко, 1990).

Отже, існує потреба в оцінці генетичного матеріалу плідників генофондових банків для встановлення основних біологічних характеристик після довготривалого терміну зберігання.

Наразі в Україні та світі селекційно-племінна робота спрямована на удосконалення вітчизняних порід сільськогосподарських тварин шляхом схрещування та отримання гібридного потомства. Такий незворотній процес загрожує зникненням вихідних порід, які найчастіше є автохтонними. Збереження таких порід у вигляді невеликих популяцій *in situ* та *ex situ* призводить до наростання в них інбридингу та виникнення явища дрейфу генів.

В сучасних умовах пріоритетним завданням збереження біологічного різноманіття є підвищення ролі сільського господарства в підтримці біорізноманітності. Незважаючи на розвиток сучасних генетичних та біотехнологічних методів відтворення тварин існує необхідність оптимізації наявних методичних підходів до одержання інформативних результатів досліджень. Розвиток та застосування

сучасних генетичних та біотехнологічних підходів ефективної репродукції сільськогосподарських тварин є складовими системи реалізації вищевказаних завдань.

Підбір оптимальних методів для комплексного оцінювання кріоконсервованого генетичного матеріалу (сперматозоїди)

Важливою умовою для успішного осіменіння самок сільськогосподарських тварин є використання біологічно повноцінної сперми. Методи оцінки такого генетичного матеріалу самців зазвичай розділяють на дві категорії:

- 1) загальні морфологічні методи досліджень;
- 2) лабораторні методи оцінки якості та функціональної повноцінності сперматозоїдів.

Основні морфологічні методи оцінки якості сперми характеризують такі показники, як: об'єм, колір, концентрація, наявність морфологічних відхилень у сперматозоїдах. Такі підходи забезпечують оцінку якості еякулятів та плідників спермопродукція, яких непридатна для штучного осіменіння. Визначальним показником, що відповідає за якість сперми є рухливість сперматозоїдів. Даний метод мікроскопічної оцінки є окомірним і суб'єктивним, проте він має велике значення під час початкової оцінки одержаного еякуляту. До запліднення не допускається сперма, в якій відсутні клітини з активним поступальним рухом. Також одним із важливих показників в оцінці якості спермопродукції плідника є тривалість виживаності сперматозоїдів та абсолютний показник виживаності.

За наявності програмного аналізатора якості спермопродукції (Sperm Quality Analyzer (SQA) V, Видеотест-Сперм, МЕКОС-Ц2-SPERM, Sperm Fertility Analyzer SFA-500, Спермоаналізатор Microptic SCA 5 (Іспанія), AndroVision і Sperm Vision компанії «Minitube») можливе визначення швидкості руху сперматозоїдів. Такі програми забезпечують оцінку 12 динамічних характеристик. Використання еякуляту для осіменіння після його розрідження,

тривалого зберігання та після процедур заморожування-розморожування, потребує проведення ретельної лабораторної оцінки. Тому увага дослідників постійно зосереджена на пошуку нових об'єктивних методів оцінки якості сперми. До одного із таких методів відноситься оцінка цілісності акросоми. Цей метод є неупередженим підходом до досліджень біологічної повноцінності сперматозоїдів, оснований на визначенні стану акросоми та мембранних структур клітини. Поряд з визначенням показників рухливості та виживаності, рекомендовано оцінювати стан акросоми розморожених сперматозоїдів.

Згідно ГОСТ 20909.3-75 рекомендовано визначення кількості патологічних форм шляхом «прижиттєвого фарбування еозином» та підрахунком живих і мертвих сперматозоїдів за загальноприйнятої методики. Оскільки морфологічні зміни можуть стосуватися будь-якої частини сперматозоїда, слід визначати кількість сперматозоїдів з відхиленнями в будові головки, шийки, тіла і хвоста (рис. 1).

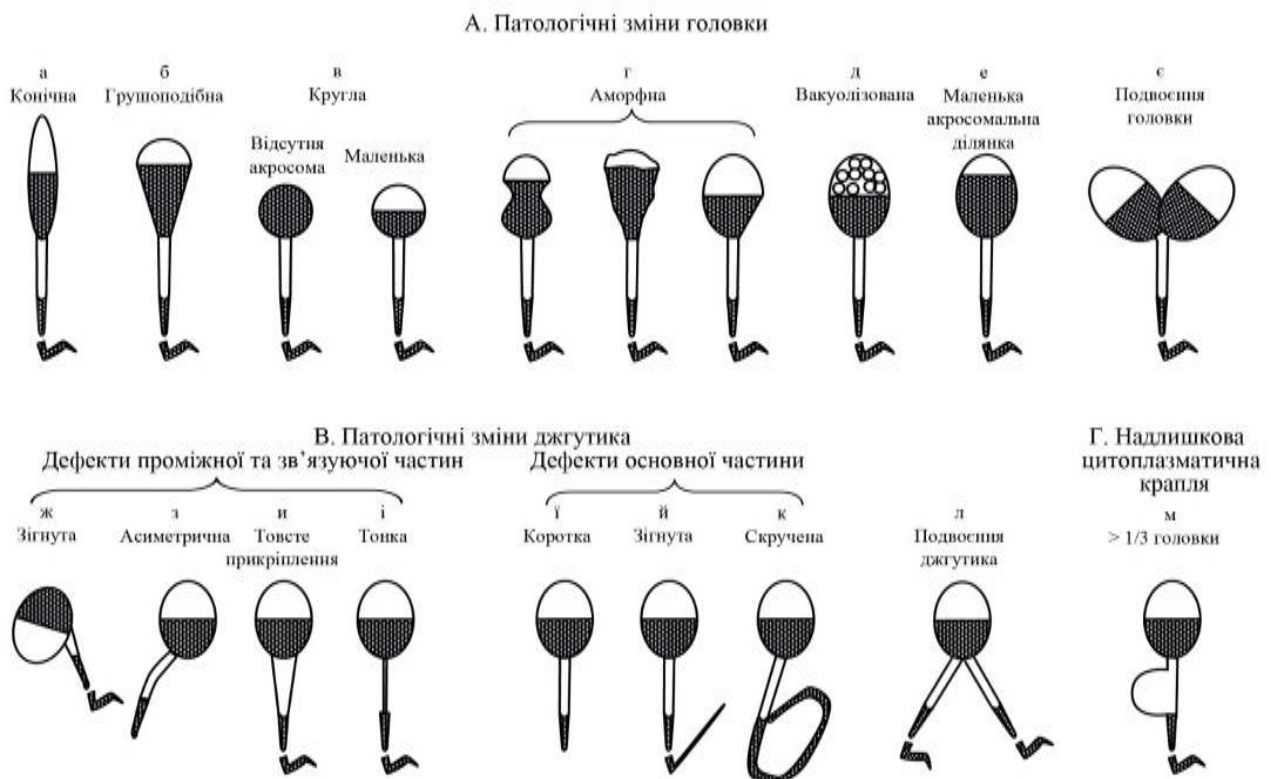


Рис. 1. Патологічні форми сперматозоїдів (схема)

Морфологічний дефект прямо пов'язаний з функціональною неповноцінністю сперматозоїда та відповідно, те чи інше порушення функції пов'язане з певним видом морфологічної аномалії. Більшість класифікацій морфологічних дефектів сперматозоїдів, ґрунтується на характеристиці їх форми та розмірів. Дослідження морфометричних характеристик сперматозоїдів слід проводити за допомогою мікроскопа згідно загальноприйнятої методики. Вивчаються такі параметри, як довжина та ширина головки, довжина хвоста, тіла та загальна довжина сперматозоїда (рис. 2).

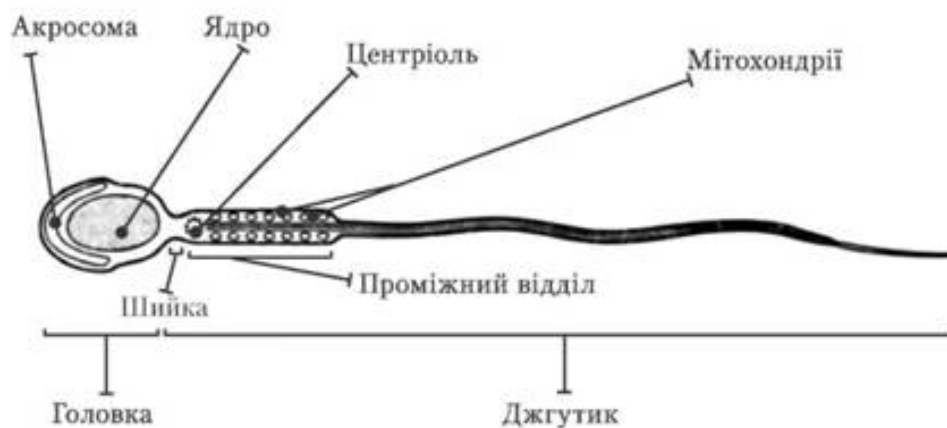


Рис. 2. Схематична будова сперматозоїда

Концентрацію сперматозоїдів у гранулі визначають за допомогою лічильної камери Горяєва, фотоелектроколориметра, спектрофотометра або іншого подібного приладу, згідно загальноприйнятих методик. Найбільш простим і доступним методом є безпосередній підрахунок сперматозоїдів у лічильній камері Горяєва. Для цього попередньо сперму набирають в еритроцитарний меланжер відповідно до мітки 0,5 і 1 (розбавлення сперми бугая в 100 раз). Потім у змішувач набирають 3%-вий розчин натрію хлориду – до поділок 101 або 11 відповідно. Великим і вказівним пальцями затискають кінці меланжера та струшують упродовж 2–3 хв. Перед внесенням сперми в лічильну камеру з капіляра змішувача видаляють чотири краплі, а після цього добре притирають покривне скло до пластинки камери та наносять збоку на сітку невелику краплю сперми з меланжера. Підраховують кількість сперматозоїдів при збільшенні мікроскопа в 200–400 разів у п'яти великих (80 малих)

квадратах по діагоналі. Рахують лише головки сперматозоїдів, які розміщені всередині малих квадратів та на їхніх лівих і верхніх лініях.

Концентрацію (C) клітин в еякулятах або спермодозі визначають за формулою:

$$C = \frac{n \cdot D \cdot S}{N \cdot p \cdot 1\,000\,000}$$

де: N – кількість малих квадратів (n = 80),

n – кількість підрахованих клітин,

D – розведення сперми у меланжері (20),

S – площа малого квадрата (400 мм²),

p – глибина камери (0,1 мм),

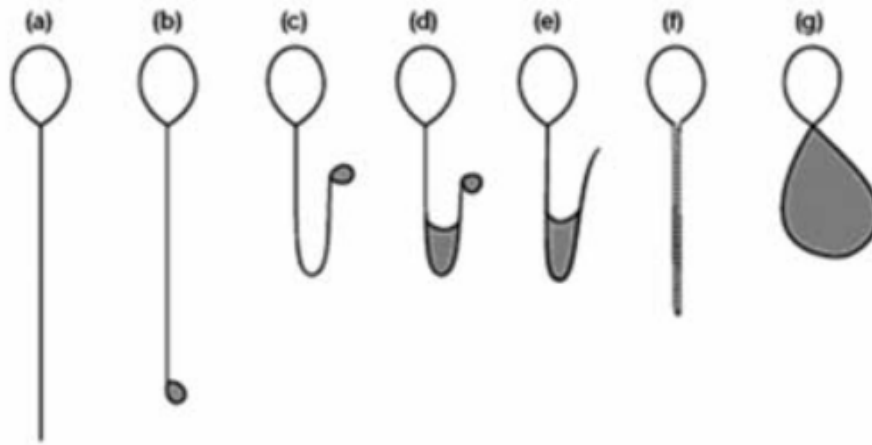
1 000 000 – коефіцієнт для перерахунку кількості сперматозоїдів (млрд./мл).

За кінцевий результат приймають середнє арифметичне з трьох визначень. Різниця між величинами не має перевищувати $\pm 10\%$.

Для визначення життєздатності сперматозоїдів деякі лабораторії застосовують тест гіпоосмотичного набухання (Hypo-osmotic Swelling Test – далі HOST). Даний тест на визначення життєздатності сперматозоїдів широко використовується в медицині та полягає в тому, що напівпроникливість внутрішньої клітинної мембрани, змушує живий сперматозоїд скручуватися в гіпоосмотичних умовах, внаслідок додаткового припливу рідини та збільшення клітинного об'єму. Оскільки він простий у виконанні, легко читається і надає додаткову інформацію про цілісність клітинної мембрани хвоста сперматозоїда, то його рекомендують використовувати для оцінки біологічної повноцінності сперми бугаїв.

Розчин для тесту готують наступним чином: 0,74 г цитрату натрію дигідрату і 1,35 г фруктози розчиняють в 100 мл дистильованої води та вносять у пробірки Епендорфа по 1 мл. Для проведення аналізу в 1 мл нагрітого гіпоосмотичного розчину

додають 0,1 мл сперми. Інкують суміш за температури + 37°C не менше 30 хв. та досліджують 100–200 сперматозоїдів під мікроскопом. Набухлі сперматозоїди ідентифікують за зміною форми клітини та скручування джгутика (рис. 3).



a) зміни відсутні,
b-g) різні типи набухання джгутиків.

Рис. 3. Типові зміни форми головок і хвостиків сперматозоїдів при гіпоосмотичному стресі (за R. S. Jeyendran, H. H. Van der Ven, M. Perez-Pelaez, B. G. Crabo, L. J. D. Zaneveld (1984))

Живі клітини ідентифікують за різними формами набухання джгутиків і підраховують як живі сперматозоїди з неушкодженими мембранами.

Результати приймаються за норму, якщо відбулося набухання хвоста більш ніж у 60% (55–63%) сперматозоїдів. Якщо набухання хвоста відбулося менш ніж у 50% сперматозоїдів, то даний зразок оцінюється як патологічний, в якому більше половини мертвих і пошкоджених клітин (рис. 3).

Перевага даного методичного підходу в порівнянні з аналізом за кількістю живих клітин і абсолютним показником виживаності полягає в тому, що можна визначати кількість сперматозоїдів з високою біологічною повноцінністю (g на рис. 3). Використання більш складних і трудомістких способів оцінки недоцільно застосовувати в повсякденній лабораторній практиці, але є необхідним для фундаментального вивчення зв'язку будови

сперматозоїда з його функціями. При технологічній обробці сперми, розведенні її синтетичними середовищами та зберіганні в охолодженому та замороженому стані відбуваються помітні структурні та біологічні пошкодження сперматозоїдів, що значно знижує їх фертильність. Тому важливо застосовувати комплексні методи оцінки якості сперми та сучасні системи аналізу, що дозволить всебічно охарактеризувати якість сперматозоїдів самців.

Застосування методів ембріологічної генетики для оцінки життєздатності кріоконсервованих гамет

Перший етап досліджень передбачав оцінку впливу тривалості зберігання у рідкому азоті сперматозоїдів плідників на їх життєздатність. В дослідженнях використані кріоконсервовані еякульовані сперматозоїди бугаїв сірої української породи (Барвінок 8247, Інжир 7927, Гігант 5948 та Запад 2705), спермопродукція яких зберігається в банку генетичних ресурсів тварин Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН понад 25 років.

Встановлено, що термін зберігання кріоконсервованих сперматозоїдів досліджуваних бугаїв не мав суттєвого впливу на життєздатність гамет після розморожування. Гамети бугаїв Барвінок 8247 та Інжир 7927, які перебувають кріоконсервованими 48 років, проявили активність на рівні 50 та 40%, відповідно. Виживаність сперматозоїдів цих бугаїв була однаковою та становили 3 години. Після аналізу розморожених сперматозоїдів бугая Гігант 5948, які зберігалися кріоконсервованими 40 років, встановлено активність гамет на рівні 60% і виживаність 6 годин. В результаті аналізу сперматозоїдів бугая Запад 2705, які перебувають замороженими 27 років, встановлено активність гамет на рівні 60% та виживаність 3 години.

Найпоширенішим методом визначення фертильності самців сільськогосподарських тварин є оцінка запліднювальної здатності сперматозоїдів за результатами штучного осіменіння корів і телиць. Тому наступним етапом було дослідити запліднювальну здатність

гамет бугаїв Барвінок 8247, Інжир 7927, Гігант 5948 та Запад 2705 за результатами нехірургічного вилучення ембріонів від донорів сірої української породи на 7 день після штучного осіменіння. Встановлено, що високою була запліднювальна здатність сперматозоїдів бугая Запад 2705, яка сягала 57,1% (4 ембріона із 7 вимитих клітин), а найнижчою була у бугая Барвінок 8247 – 20,0% (1 ембріон із 5 вимитих клітин) вимитих ембріонів від донорів були повноцінними і придатними для трансплантації. Подібною була запліднювальна здатність сперматозоїдів бугаїв Інжир 7927 і Гігант 5948, яка сягала 26,7% (4 ембріона із 15 вимитих клітин) і 33,3% (21 ембріон із 63 вимитих клітин) відповідно.

Слід зазначити, що середній термін зберігання спермопродукції досліджуваних бугаїв склав 40,8 років, середній рівень активності сперматозоїдів за такого терміну зберігання сягав 52,5% із середнім показником виживаності 3,8 години. Такі показники життєздатності сперматозоїдів забезпечили отримання 30 придатних для трансплантації ембріонів, що забезпечило запліднювальну здатність таких сперматозоїдів на рівні 33,3%.

Отже, застосовані комплексні ембріотехнологічні підходи на перспективу забезпечать раціональне використання генофонду аборигенних порід. Таким чином буде реалізована ідея щодо принципів збереженні генофонду.

Таким чином, під час розробки методичних підходів для оцінки біологічного матеріалу тривалого зберігання необхідно застосовувати комплекс сучасних інформативних біотехнологічних методів.

Молекулярно-генетична оцінка ембріонів сірої української породи за поліморфізмом гена тиреоглобуліну

Сіра українська порода великої рогатої худоби є однією з аборигенних (автохтонних) порід України і відноситься до сірої степової худоби м'ясо-молочного напрямку продуктивності.

Одним з напрямів збереження генофонду сірої української породи є кріоконсервація гамет та ембріонів і проведення їхньої

генетичної паспортизації. Важливого значення набуває визначення генотипу ембріонів за генами господарсько-цінних ознак. До таких генів належить тиреоглобулін (TG). Відомо, що підшкірний шар та загальний відсоток жиру в тканинах знаходиться під впливом поліморфізму гена TG, який має два алельні варіанти С і Т. Ген тиреоглобуліну включено до комерційних панелей діагностики великої рогатої худоби за якісними показниками м'ясної продукції GeneSTAR Quality Grade (Genetic Solution/Bovigen Pty. Ltd.) і остання валідація підтвердила асоціацію алеля Т з якісними показниками м'яса.

Метою наших досліджень було проаналізувати генотипи батьків ембріонів сірої української породи великої рогатої худоби, які закладені в Банк генетичних ресурсів Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН за геном тиреоглобуліну, а також спрогнозувати їхні можливі генотипи за даним геном.

В Банк генетичних ресурсів Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН на початку 2013 року закладено 30 ембріонів сірої української породи великої рогатої худоби, які були вилучені від корів і телиць ДП ДГ «Поливанівка». Ембріони були отримані від телиць – Пальма 8938, Редиска 6532 і Сауна 9023 та корів – Зарніца 1082, Турбіна 2250, Тайга 0505, Земфіра 0582. Для осіменіння їх після суперовуляції використано сперму бугаїв Інжира 7927, Барвінка 8247, Гіганта 5948, Запада 2705, яка знаходиться в Банку генетичних ресурсів Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН. Так від ♀Пальми 8938 і ♂Інжира 7927 закладено 2 ембріони, від ♀Редиски 6532 і ♂Інжира 7927 – 2, від ♀Сауни 9023 і ♂Барвінка 8247 – 1, від ♀Зарніци 1082 і ♂Гіганта 5948 – 9, від ♀Турбіни 2250 і ♂Гіганта 5948 – 7, від ♀Тайги 0505 і ♂Гіганта 5948 – 5, від ♀Земфіри 0582 і ♂Запада 2705 – 4 ембріони (табл. 1).

1. Очікувані генотипи кріоконсервованих ембріонів за геном тиреоглобуліну

Батьківська пара	Генотипи ембріонів
Пальма 8938 і Інжир 7927	СС або ТС
Редиска 6532 і Інжир 7927	СС або ТС
Сауна 9023 і Барвінок 8247	СС
Зарніца 1082 і Гігант 5948	СС або ТС
Турбіна 2250 і Гігант 5948	СС
Тайга 0505 і Гігант 5948	СС
Земфіра 0582 і Запад 2705	СС або ТС

Генотипи бугаїв за геном TG були досліджені, оскільки їх сперма знаходиться в Банку генетичних ресурсів Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН (табл. 2). Встановлено, що генотип бугая Інжир 7927 є гетерозиготним, а Барвінка 8247, Гіганта 5948 і Запада 2705 – гомозиготним за алельним варіантом С. Алель Т зустрічається у даних бугаїв із частотою 0,125, а алель С -0,875. Генотипи корів і телиць за геном TG визначали за допомогою ПЛР-ПДРФ-аналізу (табл. 3). Біоматеріалом для аналізу були яйцеклітини, одержані після вимивання ембріонів (рис. 4). Тобто, це той генетичний матеріал, який дегенерував, і це спричинило відсутність формування ембріонів. Встановлено, що яйцеклітини Пальми 8938 у кількості 5 штук, Редиски 6532 – 4, Сауни 9023 – 4, Турбіни 2250 – 3 і Тайги 0505 – 5 штук несуть тільки алель С. Таким чином, вищезгадані особини з високою імовірністю є гомозиготами за алелем С. Досліджені 4 яйцеклітини Зарніци 1082 і 3 – Земфіри 0582 несуть два алельні варіанти Т і С. Таким чином, ці корови з високою імовірністю є гетерозиготами. Алель Т

зустрічається у даних корів і телиць з частотою 0,143, а алель С – 0,857.

2. Генотипи бугаїв за геном тиреоглобуліну

№ п/п	Кличка, № бугая	Генотип за геном тиреоглобуліну
1.	Інжир 7927	<u>ТС</u>
2.	Барвінок 8247	СС
3	Гігант 5948	СС
4	Запад 2705	СС

3. ПЛР-ПДРФ аналіз генотипів корів і телиць за геном тиреоглобуліну

№ п/п	Кличка, № донора	Генотип за геном тиреоглобуліну
1.	Пальма 8938	СС
2.	Редиска 6532	СС
3.	Сауна 9023	СС
4.	Тайга 0505	СС
5.	Турбіна 2250	СС
6.	Зарніца 1082	<u>ТС</u>
7.	Земфіра 0538	<u>ТС</u>

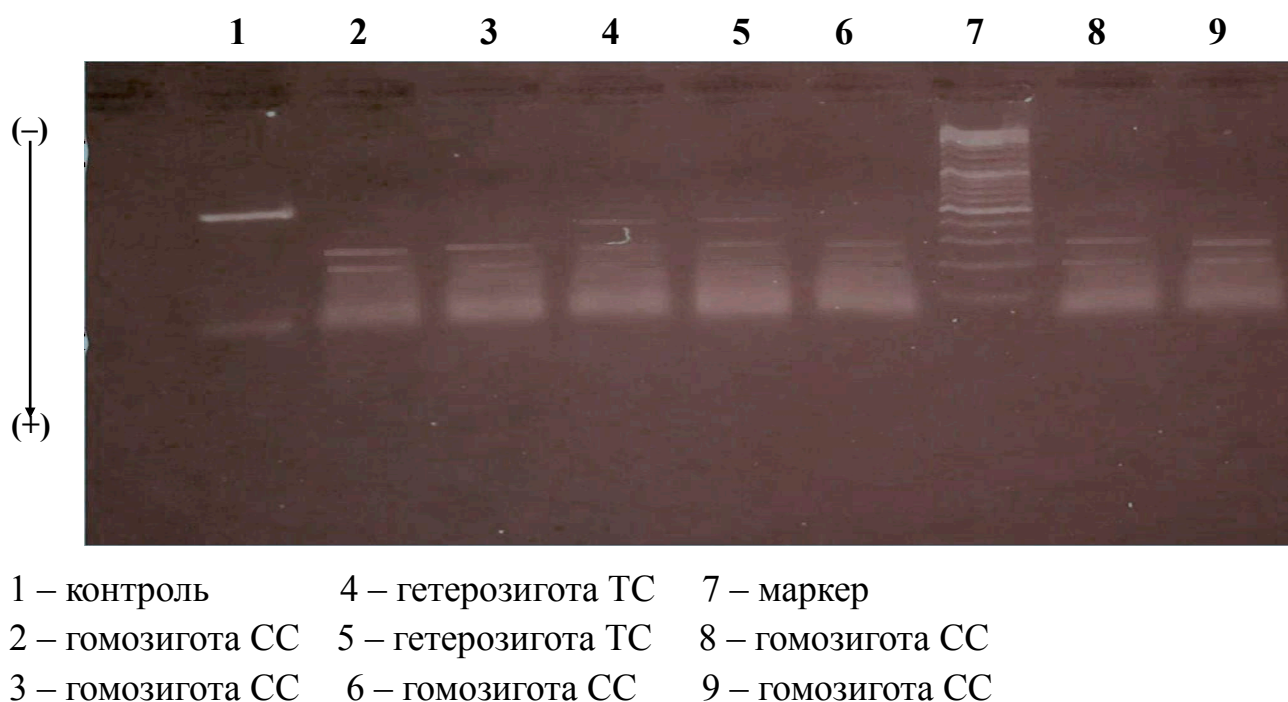


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації за праймерами, специфічними для гену тиреоглобуліну (біоматеріал – яйцеклітини)

Знаючи генотипи батьків, можна спрогнозувати генотипи ембріонів, які були закладені в банк. Так 17 ембріонів, які отримані від батьківських пар – Пальми 8938 і Інжира 7927, Редиски 6532 і Інжира 7927, Зарніци 1082 і Гіганта 5948, Земфіри 0582 і Запада 2705 імовірно є або гомозиготами за алелем С, або гетерозиготами, а 13 ембріонів від інших батьківських пар очевидно є гомозиготами за алелем С. Тому ймовірно, що серед 30 закладених ембріонів тільки 8–9 ембріонів є гетерозиготами. Вони складають приблизно 28,3% від загальної кількості ембріонів, закладених в Банк генетичних ресурсів Інституту розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН. Алель Т гена тиреоглобуліну зустрічається в ембріонах із частотою 0,142, а алель С – відповідно з частотою 0,858.

Отже, в стаді сірої української породи великої рогатої худоби в ДП ДГ «Поливанівка» тривалий час існує тісний інбридинг і виродження стада. Це підтверджується високою кількістю гомозиготних особин за алелем С. При цьому даний алель не є

бажаним для промислового виробництва. Тому для підвищення селекційної цінності даного стада потрібно збільшити частоту поширення алеля Т. Це можливо зробити тільки завдяки більш детальному аналізу поліморфізму гена тиреоглобуліну в даному стаді та відборі для відтворення таких особин, які несуть даний алель.

Перспективи застосування генетичної та біотехнологічної оцінки біоматеріалу, який тривалий час зберігається

Для реалізації завдань «Програма збереження генофонду локальних і зникаючих порід сільськогосподарських тварин в Україні на 2017–2025 роки» (2017), а саме для збереження генофонду вітчизняних порід рекомендовано застосовувати напрацювання з генетичних та біотехнологічних методів у тваринництві;

- встановлено, що за тривалого терміну зберігання спермодоз бугаїв сірої української породи (40,8 років), середній рівень активності сперматозоїдів сягав 52,5% із середнім показником виживаності 3,8 години;

- такі показники життєздатності забезпечили запліднювальну здатність сперматозоїдів на рівні 33,3% та отримання 30 придатних для трансплантації ембріонів.

ДОДАТОК

ЗАТВЕРДЖЕНО
Наказ Міністерства аграрної
політики України
06.06.2002 № 154

КАРТКА ПЛЕМІННОГО БУГАЯ М'ЯСНОЇ ПОРОДИ	Область	Район	Форма 1-м'яс
	Дніпропетровська	Магдалинівський	

Кличка Барвінок Групи крові _____
 Ідентифікаційний № UA 8247 Масть, наявність рогів _____
 Марка і № в ДКПТ ДУ-119 (5 т.) Дата народження 16.11.68
 Порода сіра українська Місце народження ДП дослідне господарство
 Породність СУ100 Дата надходження _____
 Лінія Табуна 2617 Власник ПП "Інтесел"
 Родина _____

I. Походження

Кличка	М Богачка			Б Мох
Ідентифікаційний №	5222			UA 8547
Марка і № в ДКПТ	ДУ-400 (5 т.)			ДУ-122 (т.5)
Порода	сіра українська			сіра українська
Породність	СУ100			СУ100
Лінія	Улана 3331			Табуна 2617
Родина				
Вік, місяців	59			107
Жива маса, кг	670			960
Продуктивність	Середній перебіг отелень бали			СЦІ А:
	Середня скоригована молочність кг			СЦІ Б:
Комплексна оцінка	80 балів, еліта-рекорд			94 балів, еліта
Групи крові				

Кличка	ММ Ботва	БМ Улан	МБ Муха	ББ Закат
Ідентифікаційний №	4002	UA 3331	1871	UA 4361
Марка і № в ДКПТ		ДУ-64		ХЦУ-54 (5 т.)
Порода	сіра українська	сіра українська	сіра українська	сіра українська
Породність	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100
Вік, місяців	35	64	83	42
Жива маса, кг	490	1100	560	1035
Комплексна оцінка		92 балів, еліта-рекорд	еліта-рекорд	еліта-рекорд

Кличка	МММ Брожка	БММ Запорожець	МБМ Уміла	ББМ Вінок	ММБ Мандарина	БМБ Голуб	МББ Зенітка	БББ Табун
Ідентифікаційний №	808	UA 1260	850	1319	922	UA 114	2070	2617
Марка і № в ДКПТ		ДУ-59		ДУ-61			ДУ-270	ДУ-62
Порода	СУ	СУ	СУ	СУ	СУ	СУ	СУ	СУ
Породність	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100
Комплексний клас	НБ	89 балів, ЕР	ЕР	91 балів, ЕР	НБ	НБ	НБ	90 балів, ЕР

II. Розвиток тварини

Вік тварини	ЖМ, кг	Проміри	210 дн.	8 міс.	12 міс.	15 міс.	2 р.	3 р.	4 р.	5 р.
Новонароджене		Висота у холці						161		
При відлученні		Висота в крижах								
(210 дн.)		Глибина грудей						82		
8 міс.		Ширина грудей						53		
12 міс.		Ширина в кульш. з'єднан.								
15 міс.		Ширина у маклоках						51		
18 міс.		Коса довжина тулуба						177		
При 1-му використанні		Коса довжина задку								
		Спіральний промір стегна								
2 роки		Обхват грудей						222		
3 роки		Обхват п'ястки						25.5		
4 роки		Обхват сім'яників								
5 років і старше		Бал за екстер'єр								

Фото (абрис)

Вали екстер'єру

IV. Оцінка за власною продуктивністю

Жива маса, кг		Середньо-добовий приріст, г	Витрати кормів, к.од/кг	М'ясні форми, бал	Клас	Індекс, %
при поста-новці у 8 міс.	при знятті у 15 міс.					

КАРТКА ПЛЕМІННОГО БУГАЯ М'ЯСНОЇ ПОРОДИ		Область Дніпропетровська	Район Магдалинівський	Форма 1-м'яс
Кличка	Інжир	Групи крові		
Ідентифікаційний №	UA 7927	Мась, наявність рогів		
Марка і № в ДКПТ	ДУ-120 (5 т.)	Дата народження 30.03.68		
Порода	сіра українська	Місце народження ДП дослідне господарство		
Породність	СУ100	Дата надходження		
Лінія	Інжира 7927	Власник ПП "Інтесел"		
Родина				

I. Походження

Кличка	М	Іриска	Б	Гриф
Ідентифікаційний №	5180	4181	ДУ-331	
Марка і № в ДКПТ	ДУ-584 (5 т.)	сіра українська	СУ100	Грифа 4181
Порода	сіра українська			
Породність	СУ100			
Лінія	Табуна 2617			
Родина				
Вік, місяців	119	95		
Жива маса, кг	750	870		
Продуктивність	Середній перебіг отелень бали	СЦІ А:		
	Середня скоригована молочність кг	СЦІ Б:		
Комплексна оцінка	84 балів,	89 балів, еліта-рекорд		
Групи крові				

Кличка	ММ	Іркутська	БМ	Табун	МБ	Гресса	ББ	Запорожець
Ідентифікаційний №	3876	2617	810	ДУ-228	ДУ-59			
Марка і № в ДКПТ	ДУ-311	сіра українська	СУ100	95	530	840		
Порода	сіра українська	СУ100	90 балів, еліта-рекорд	еліта-рекорд	89 балів, еліта-рекорд			
Породність	СУ100	83						
Вік, місяців	47	990						
Жива маса, кг	500							
Комплексна оцінка								

Кличка	МММ	БММ	МБМ	ББМ	ММБ	БМБ	МББ	БББ
Ідентифікаційний №	671	264	677	1026	UA 1016	UA 123	1599	UA 63
Марка і № в ДКПТ	ДУ-137	ДУ-56	ДУ-154	ДУ-55	ДУ-26	ДУ-8 (4 т.)		
Порода	СУ	СУ	СУ	СУ	СУ	СУ	СУ	СУ
Породність	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100
Комплексний клас	ЕР	ЕР	ЕР	ЕР	1К	1К	Ел	Ел

II. Розвиток тварини		III. Проміри тварини (см) у віці									Фото (абрис)
Вік тварини	ЖМ, кг	Проміри	210 дн.	8 міс.	12 міс.	15 міс.	2 р.	3 р.	4 р.	5 р.	
Новонароджене		Висота у холці							165		
При відлученні		Висота в крижах									
(210 дн.)		Глибина грудей							89		
8 міс.		Ширина грудей							61		
12 міс.		Ширина в кульш. з'єднан.									
15 міс.		Ширина у маклоках							57		
18 міс.		Коса довжина тулуба							183		
При 1-му використанні		Коса довжина задку									
		Спіральний промір стегна									
2 роки		Обхват грудей							241		
3 роки		Обхват п'ястка							26.0		
4 роки		Обхват сім'яників									
5 років і старше		Бал за екстер'єр									
Вали екстер'єру		IV. Оцінка за власною продуктивністю									
		Жива маса, кг		Середньо-добовий приріст, г	Витрати кормів, к.од/кг	М'ясні форми, бал	Клас	Індекс, %			
		при поста-новці у 8 міс.	при знятті у 15 міс.								

КАРТКА ПЛЕМІННОГО БУГАЯ М'ЯСНОЇ ПОРОДИ		Область Черкаська	Район Чорнобаївський	Форма 1-м'яс
Кличка	Гігант	Групи крові		
Ідентифікаційний №	UA 5948	Масль, наявність рогів		
Марка і № в ДКПТ		Дата народження 11.07.76		
Порода	сіра українська	Місце народження КСП "Вериміївський"		
Породність	СУ100	Дата надходження		
Лінія	Чудового 1276	Власник ПП "Інтесел"		
Родина				

I. Походження

Кличка	М Гітара	Б Чудовий
Ідентифікаційний №	UA 1041	UA 1276
Марка і № в ДКПТ	ЧРУ-57 (5 т.)	ЧРУ-5 (5 т.)
Порода,	сіра українська	сіра українська
Породність	SU100	SU100
Лінія	Табуна 2617	Чудового 1276
Родина		
Вік, місяців	35	18
Жива маса, кг	490	635
Продуктивність	Середній перебіг отелень бали	СЦІ А:
	Середня скоригована молочність кг	СЦІ Б:
Комплексна оцінка	74 балів, еліта	92 балів, еліта-рекорд
Групи крові		

Кличка	ММ Груша	БМ Снігур	МБ Чарівна	ББ Гібрид
Ідентифікаційний №	UA 5134	UA 5285	UA 3104	UA 4125
Марка і № в ДКПТ		ЧРУ-2 (5 т.)	ЧРУ-19 (5 т.)	ХЦУ-53 (5 т.)
Порода	сіра українська	сіра українська	сіра українська	сіра українська
Породність	SU100	SU100	SU100	SU100
Вік, місяців		64	12	39
Жива маса, кг		1150	530	955
Комплексна оцінка		91 балів, еліта-рекорд	74 балів, еліта	87 балів, еліта

Кличка	МММ	БММ	МБМ	ББМ	ММБ	БМБ	МББ	БББ
Ідентифікаційний №			Сирена	Закат	Красавка	Герой	Гавань	Запорожець
Марка і № в ДКПТ			UA 798	UA 4361	UA 62	UA 974	2526	UA 1260
Порода			ХЦУ-589 (т.5)	ХЦУ-54 (5 т.)				ДУ-59
Породність			SU	SU	SU	SU	SU	SU
Комплексенний клас			SU100	SU100	SU100	SU100	SU100	SU100
			1K	EP	НБ	НБ	НБ	89 балів, EP

II. Розвиток тварини

Вік тварини	ЖМ, кг
Новонароджене	
При відлученні	
(210 дн.)	
8 міс.	
12 міс.	
15 міс.	
18 міс.	
При 1-му використанні	
2 роки	
3 роки	
4 роки	
5 років і старше	

Вади екстер'єру

III. Проміри тварини (см) у віці

Проміри	210 дн.	8 міс.	12 міс.	15 міс.	2 р.	3 р.	4 р.	5 р.
Висота у холці				127				
Висота в крижах				137				
(210 дн.)				64				
Ширина грудей				41				
Ширина в кульш. з'єднан.								
Ширина у маклоках				41				
Коса довжина тулуба				138				
Коса довжина заду				50				
Спіральний промір стегна								
Обхват грудей				185				
Обхват п'ястка				22.0				
Обхват сім'яників								
Бал за екстер'єр								

IV. Оцінка за власною продуктивністю

Жива маса, кг		Середньо-добовий приріст, г	Витрати кормів, к.о./кг	М'ясні форми, бал	Клас	Індекс, %
при постановці у 8 міс.	при знятті у 15 міс.					

Фото (абрис)

КАРТКА ПЛЕМІННОГО БУГАЯ М'ЯСНОЇ ПОРОДИ	Область	Район	Форма 1-м'яс
	Дніпропетровська	Магдалинівський	

Кличка	Запад	Групи крові
Ідентифікаційний №	UA 2705	Мась, наявність рогів
Марка і № в ДКПТ		Дата народження
Порода	сіра українська	Місце народження
Породність	СУ100	Дата надходження
Лінія	Улана 3331	Власник
Родина		

I. Походження

Кличка	М	Золушка	Б	Гіпс
Ідентифікаційний №	8446		UA 121	
Марка і № в ДКПТ			ДУ-132 (т.6)	
Порода	сіра українська		сіра українська	
Породність	СУ100		СУ100	
Лінія	Улана 3331		Улана 3331	
Родина				
Вік, місяців	64		36	
Жива маса, кг	500		785	
Продуктивність	Середній перебіг отелень бали		СЦІ А:	
	Середня скоригована молочність кг		СЦІ Б:	
Комплексна оцінка			55 балів, II-й клас	
Групи крові				

Кличка	ММ	Зурна	БМ	Пробний	МБ	Глорія	ББ	Первенец
Ідентифікаційний №	3076		UA 2653		3352		UA 5027	
Марка і № в ДКПТ			ДУ-140 (т.7)				ДУ-150 (т.7)	
Порода	сіра українська		сіра українська		сіра українська		сіра українська	
Породність	СУ100		СУ100		СУ100		СУ100	
Вік, місяців			84		83		55	
Жива маса, кг			1000		670		1010	
Комплексна оцінка	еліта		85 балів, еліта-рекорд		85 балів, еліта-рекорд		90 балів, еліта-рекорд	

Кличка	МММ	БММ	МБМ	ББМ	ММБ	БМБ	МББ	БББ
Ідентифікаційний №			Проба	Град	Гроза	Тюльпан	Пічуга	Пробний
Марка і № в ДКПТ			1180	UA 1177	UA 782	UA 9675	3388	UA 2653
Порода			СУ	СУ	СУ	ДУ-126 (т.5)		ДУ-140 (т.7)
Породність			СУ100	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100	СУ100
Комплексний клас			Ел	91 балів, ЕР	86 балів, Ел	86 балів, Ел	95 балів, ЕР	85 балів, ЕР

II. Розвиток тварини		III. Проміри тварини (см) у віці									Фото (абрис)
Вік тварини	ЖМ, кг	Проміри	210 дн.	8 міс.	12 міс.	15 міс.	2 р.	3 р.	4 р.	5 р.	
Новонароджене	39	Висота у холці					141				
При відлученні		Висота в крижах									
(210 дн.)		Глибина грудей					80				
8 міс.		Ширина грудей					42				
12 міс.	319	Ширина в кульш. з'єднан.									
15 міс.	389	Ширина у маклоках					50				
18 міс.	460	Коса довжина тулуба					173				
При 1-му використанні		Коса довжина задку									
		Спіральний промір стегна									
2 роки		Обхват грудей					208				
3 роки		Обхват п'ястка					23.0				
4 роки		Обхват сім'яників									
5 років і старше		Бал за екстер'єр					91				
Вали екстер'єру		IV. Оцінка за власною продуктивністю									
		Жива маса, кг		Середньо-добовий приріст, г	Витрати кормів, к.од/кг	М'ясні форми, бал	Клас	Індекс, %			
		при поста-новці у 8 міс.	при знятті у 15 міс.								

СПИСОК РЕКОМЕНДОВАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Бегма, Л. О. Методики оцінки якості спермій при кріоконсервації / Л. О. Бегма, А. А. Бегма // Методики наукових досліджень із селекції, генетики та біотехнології у тваринництві. – К. : Аграрна наука, 2005. – С. 161–172.
2. Бугров, А. Д. Криоповреждения и криозащита спермиев быков при глубококом замораживании : монография / Ин-т животноводства НААНУ ; А. Д. Бугров. – Харьков. – 2010. – 317 с.
3. ГОСТ 20909.3-75. Сперма быков неразбавленная. Методы морфологических исследований. – 1988. – 6 с.
4. ГОСТ 27777 88. Сперма быков замороженная. Методы биологических исследований. Введ. 01.07.89. до 01.07.94. – М.: Изд-во стандартов, 1988. – 6 с.
5. Інструкція зі штучного осіменіння корів і телиць. – К. : Міністерство аграрної політики України, 2001. – 40 с.
6. Колтовой, Н. А. Современные методы анализа подвижности сперматозоидов / Н. А. Колтовой // Проблемы репродукции. – 2009. – № 5. – С. 44–47.
7. Кругляк, А. П. Якість замороженої сперми, що зберігалася понад 40 років / А. П. Кругляк // Розведення і генетика тварин : міжвід. темат. наук. зб. – К. : Аграрна наука, 2001. – Вип. 34. – С. 66–67.
8. Методичні рекомендації з кріоконсервації сперматозоїдів та ооцитів сільськогосподарських тварин і формування ембріонів *in vitro* / С. І. Ковтун, Н. П. Галаган, О. В. Щербак, П. А. Троцький. – Чубинське, 2016. – 17 с.
9. Методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин / М. В. Зубець, В. П. Буркат, Ю. Ф. Мельник та ін. ; наук. ред. І. В. Гузева. – К. : Аграрна наука, 2007. – 120 с.
10. Наук, В. А. Длительное сохранение спермы сельскохозяйственных и диких животных / В. А. Наук, Г. В. Борончук, Н. Н. Ротт // Консервация генетических ресурсов : сб. науч. тр. – Пушино, 1991. – С. 35–81.
11. Осташко, Ф. И. Глубокое замораживание и длительное хранение спермы производителей. – К., Урожай, 1978. – 255 с.
12. Плешаков, В. А. Влияние сроков хранения криоконсервированной спермы быков-производителей на ее качество : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук / В. А. Плешаков : 06.01.04. – Барнаул. – 2006. – 21 с.
13. Програма збереження генофонду локальних і зникаючих порід сільськогосподарських тварин в Україні на 2017–2025 роки. – Суми, 2018. – 84 с.

14. Селекційні, генетичні та біотехнологічні методи удосконалення і збереження генофонду порід сільськогосподарських тварин / М. В. Гладій, М. І. Башенко, Ю. П. Полупан [та ін.] ; за ред. М. В. Гладія і Ю. П. Полупана ; Ін-т розведення і генетики тварин ім. М.В.Зубця НААН. – Полтава, ТОВ «Фірма «Техсервіс», 2018. – 791 с.

15. Сучасні аспекти кріоконсервації сперми бугаїв / М. В. Зубець, В. П. Буркат, А. А. Бегма, Л. О. Бегма // Вісник Полтавського державного сільськогосподарського інституту. – 2000. – № 1. – С. 40–44.

16. Щербак, О. В. Біотехнологічна підготовка сперматозоїдів ссавців для ДНК-аналізу / О. В. Щербак, С. І. Ковтун // Геномна селекція у тваринництві: стан та перспективи розвитку : мат. твор. диск. – К. : Аграрна наука, 2011. – С. 72–75.

17. Щербак, О. В. Вплив наноматеріалів на життєздатність кріоконсервованих сперматозоїдів бугаїв / О. В. Щербак, Л. М. Гончаренко // Вісн. степу : наук. зб. – 2011. – С. 145–147.

18. Dowling-Lacey, D. Live birth from a frozen–thawed pronuclear stage embryo almost 20 years after its cryopreservation / D. Dowling-Lacey, J. F. Mayer, E. Jones, S. Bocca, L. Stadtmayer, S. Oehninger // Fertility and Sterility. – 2010. – V. 95, I. 3. – P 120.e1-1120.e3.

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

Щербак Оксана Василівна
Ковтун Світлана Іванівна
Зюзюн Аза Богданівна
Троцький Петро Анатолійович

МЕТОДИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ ОЦІНКИ БІОМАТЕРІАЛУ ЗА ТРИВАЛОГО ЙОГО ЗБЕРІГАННЯ

За редакцією доктора сільськогосподарських наук, професора,
академіка НААН С. І. Ковтун

Комп'ютерна верстка та макетування П. А. Троцький

Підписано до друку 30.11.2018 р.
Формат 60 × 84 1/16
Ум. друк. арк. 1,4
Наклад 100 прим.