



УНИВЕРСАЛЬНЫЙ ПРИБОР ДЛЯ НЕФРАКЦИОННОГО ОСЕМЕНЕНИЯ СВИНЕЙ И СПОСОБ ВВЕДЕНИЯ СПЕРМЫ ХРЯКОВ

Бугров А. Д., Мартынюк И. Н., Институт животноводства НААН

В статье изложены результаты исследований по усовершенствованию прибора для нефракционного искусственного осеменения свиней и способа введения спермы хряков. С помощью предлагаемого прибора для нефракционного осеменения свиней, учитываются анатомо-физиологические особенности ремонтных свинок и основных свиноматок. Установлено, что благодаря использованию разработанного универсального прибора и способа введения спермы, после осеменения, сперма не выливается из половых путей, обеспечивает такую же оплодотворяющую способность после введения 50 см³ с содержанием 1,5–2,0 млрд. спермиев, как и объемом 100 см³. Использование прибора дает возможность повысить оплодотворяющую способность свиней на 8,3–10 % по сравнению с аналогом прибора.

Ключевые слова: прибор, катетер, способ введения, свиноматки.

UNIVERSAL DEVICE FOR UNFRACTIAL INSEMINATION OF PIGS AND METHOD OF BOAR SPERM INTRODUCTION

A.D. Bugrov, I.N. Martinyuk, Institute of animal science UAAS

The results by researches by the improvement of device for unfractial artificial insemination of pigs and method of boars sperm introduction are expounded in the article. By means of the proposed device for unfractial artificial insemination of pigs the anatomy and physiology characteristics of repair piggies and main sows could be considered. There were established that due to the use of the developed universal device and sperm introduction method sperm doesn't outpour from genital tracts after insemination, providing the same impregnating ability after introducing 50 cm³ with 1.5–2.0 milliards of sperm keeping, as with 100 cm³ content. Using the device gives a possibility to increase impregnating ability of pigs on 8.3–10 % compared with device analogue.

Keywords: device, catheter, method of introduction, sow.

УДК 636.082.453.52:578.086

КОЛИЧЕСТВО ДНК В СПЕРМИЯХ И ПЛОДОВИТОСТЬ ЖИВОТНЫХ

Васильев В.С., к. б. н.

Харьковская государственная зооветеринарная академия

Изучали количественные показатели спермиев животных и человека методами интерференционной микроскопии. Количество ДНК в головках спермиев исследованных быков варьировало в пределах от 1,85 до 4,24 пг. Наивысшей плодовитостью обладали те быки, у которых в спермиях содержалось от 2,7 до 2,9 пг. Сухая масса головок спермиев быков в среднем была равна 8,67 пг, хряков – 8,78 пг, баранов – 8,39 пг, кобелей – 6,24 пг, петухов – 2,59 пг, индюков- 3,7 пг, мужчин- 7,26 пг. Количество Junk- ДНК может составлять до 56 % от всего ДНК в спермиях.

Ключевые слова: junk-ДНК, спермии, интерференционная микроскопия, лазер.

Широкомасштабная селекция животных, с необходимыми хозяйственно-полезными признаками, в современных условиях не возможна без вспомогательных репродуктивных технологий [1]. Важное значение в воспроизводстве живот-



ных имеет объективная оценка качества спермы. Для этих целей наиболее перспективно применение методов интерференционной микроскопии. Интерференционный биологический микроскоп позволяет наблюдать живые, неокрашенные клетки с хорошим контрастом и проводить количественные измерения концентрации вещества, определять различные дефекты строения клеток, сухую массу, количество ДНК, белка в них [2]. В последнее время в результате исследования генома человека рядом авторов было показано, что до 90 % информации, заключенной в ДНКБ, не используется, то есть такая ДНК является хламом или junk-DNA [3]. В этой связи была поставлена задача оценить количество «мусорной» ДНК в спермиях быков методами интерференционной микроскопии и взаимосвязь «молчащих» нуклеотидных последовательностей с плодовитостью животных.

Материалы и методы исследований. Исследовали нативную и технологически обработанную (криоконсервация, лазерное облучение) сперму быков, хряков, баранов, других животных и птиц и, в сравнительном аспекте, сперму человека. Определяли традиционными методами: объем, активность, концентрацию, цвет, биохимические и другие показатели, для спермы человека определяли число активно-подвижных, подвижных, местно-качающихся и неподвижных спермиев в каждом эякуляте [2, 4].

С помощью интерференционной микроскопии определяли частоту различных дефектов в строении спермиев, измеряли размеры, сухую массу головок спермиев, количество ДНК и белков в них [2]. Учитывались возраст, порода животных, влияние генотипических и фенотипических факторов на качество спермы. Воспроизводительные способности племенных быков оценивали по результатам оплодотворения коров после первого осеменения. Опыты проводились с 1972 года по настоящее время в ХГЗВА, Институте животноводства НААНУ, ХНТУСХ, ИКиК НАНУ, Харьковской госплемстанции и др. предприятиях. Результаты измерений обрабатывали общепринятыми статистическими методами с помощью программного обеспечения MATCAD и Maple-12 [5].

Результаты исследований. Хорошие условия для наблюдения под микроскопом образцов нативной или технологически обработанной спермы, мазков спермы создает дифференциальный интерференционный контраст (ДИК) при увеличении в 200 – 400 раз в однородном интерференционном сером, желто-коричневом или голубом цветах. На рис. 1 представлено изображение образца размороженной криоконсервированной спермы быка в ДИК на сером фоне. Небольшое раздвоение изображений в доли микрометра создает стереозффект, отменяющий изображение каждой клетки и позволяющий с хорошей контрастностью изучать нормальные и патологические формы спермиев.

В случае большого раздвоения (рис. 2), изображения каждой клетки, в которых фазы колебаний световых волн сдвинуты относительно фона на одинаковые величины, окрашены в разные интерференционные цвета. Сдвиг фазы в изображении тем больше, чем больше толщина и концентрация вещества в клетке. Измеряя сдвиг фазы световых волн, прошедших через клетку, зная размер клетки, можно рассчитать сухую массу клетки, распределение концентрации вещества в клетке, показатель преломления и другие количественные характеристики клеток [2].

Значение изучения количественных показателей клеток спермы животных и человека методами интерференционной микроскопии для определения плодовитости и состояния репродуктивной системы животных было показано в предыдущих работах [1, 2, 4]. Средние значения сухой массы головок спермиев для каждого из 98 исследованных быков представлены на рис. 3.

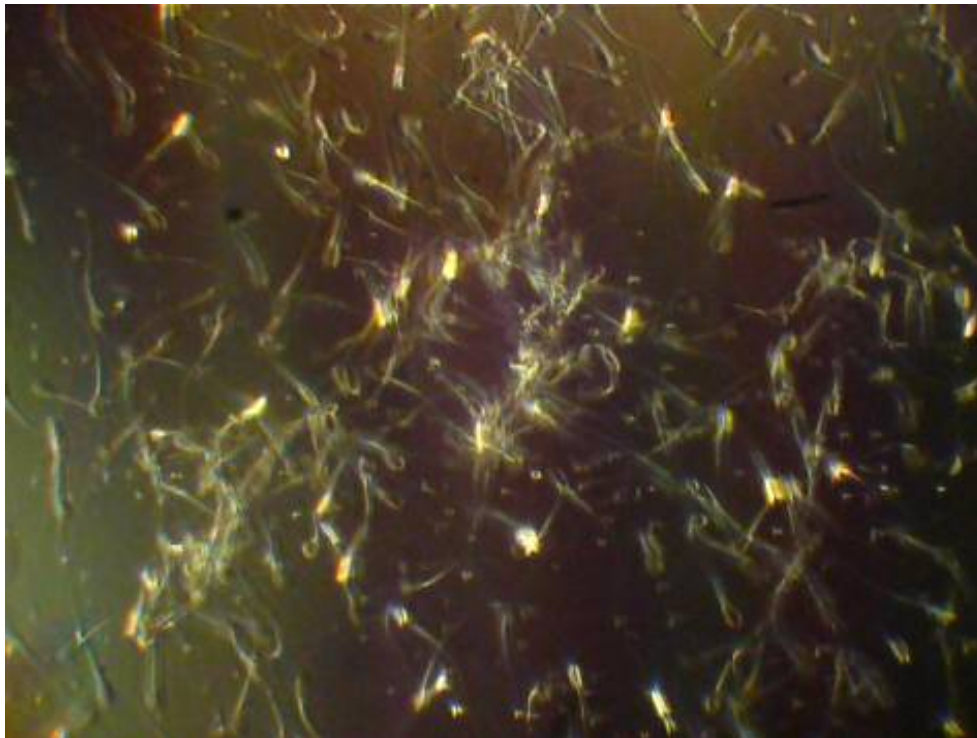


Рис. 1. Изображение спермиев быка в дифференциальном интерференционном контрасте в сером фоне.



Рис. 2. Большое раздвоение изображений спермиев быка в однородном сером интерференционном цвете.

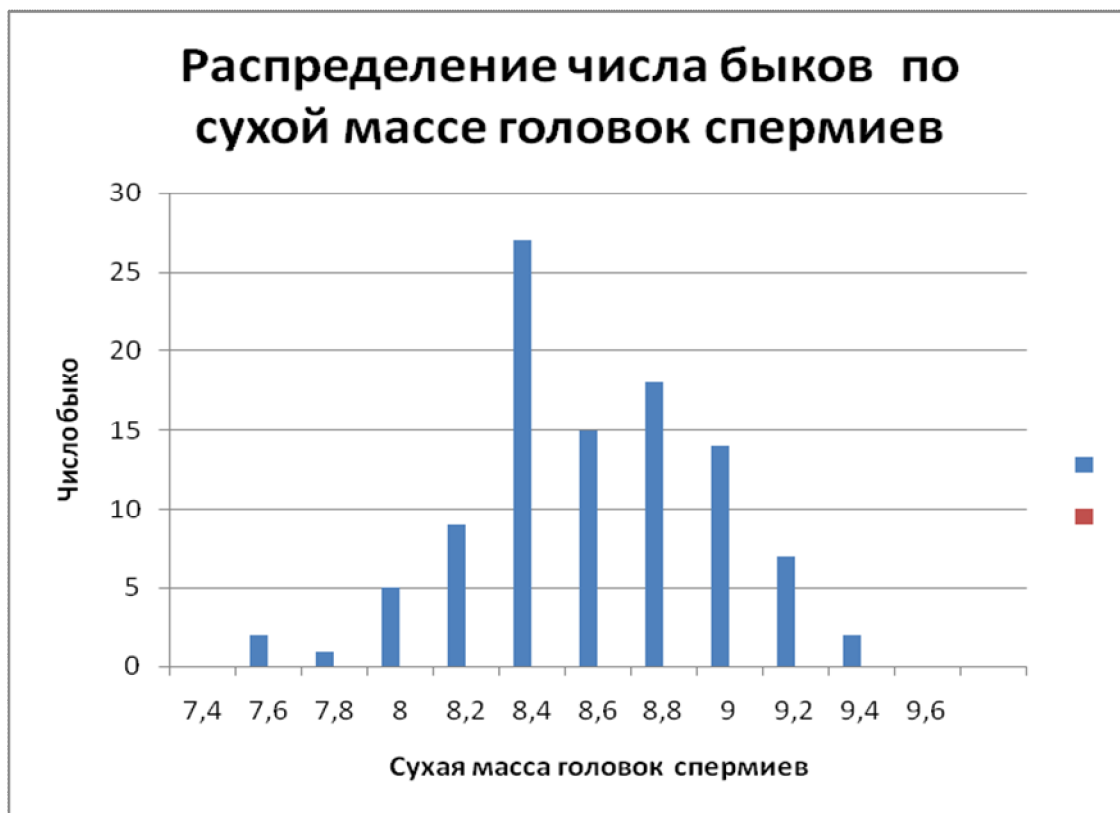


Рис. 3. Распределение числа быков по средним значениям сухой массы головок спермиев в пикограммах.

Наименьшая сухая масса головок спермиев (7,61 пг) была в эякулятах быка Русак-7254 симментальской породы, а наиболее «тяжелые» были спермии в эякулятах быка Гранит-1102, черно-пестрой породы. Большая часть быков имели сухую массу головок спермиев от 8,3 до 9,1 пг и, соответственно, обладали более высокой оплодотворяющей способностью [6].

На наш взгляд, наиболее тесная взаимосвязь плодовитости быков должна быть с количеством ДНК в головках спермиев, поскольку все наследственные признаки передаются потомкам в виде генов – определенных нуклеотидных последовательностей. Распределение числа быков по содержанию ДНК (в пикограммах) в головках спермиев представлено на рис. 4.

Средние значения количества ДНК в головках спермиев исследованных быков имели широкий разброс (дисперсию) от 1,85 пг до 4,24 пг. Большая часть быков имели количество ДНК – от 2,3 до 3,7 пг. На рис. 5 представлены результаты осеменения коров спермой быков с разным уровнем ДНК в головках спермиев. Из представленных данных следует, что наибольшей плодовитостью обладали быки, в спермиях которых содержалось от 2,7 до 2,9 пг ДНК. С уменьшением уровня ДНК в спермиях от 2,70 до 1,85 пг оплодотворяемость коров, такой спермой, существенно уменьшалась с 47 % до 27 % в среднем. А спермой быка Консул-5354, имеющего количество ДНК в спермиях равное 1,85 пг, оплодотворено коров с первого осеменения только в 14,7 % случаев. Снижение среднего уровня оплодотворяемости вполне достоверно, поскольку $t=2,36$ и $P<0,05$ [7].



Рис. 4. Распределение числа быков по количеству ДНК в головках спермиев в пикограммах.

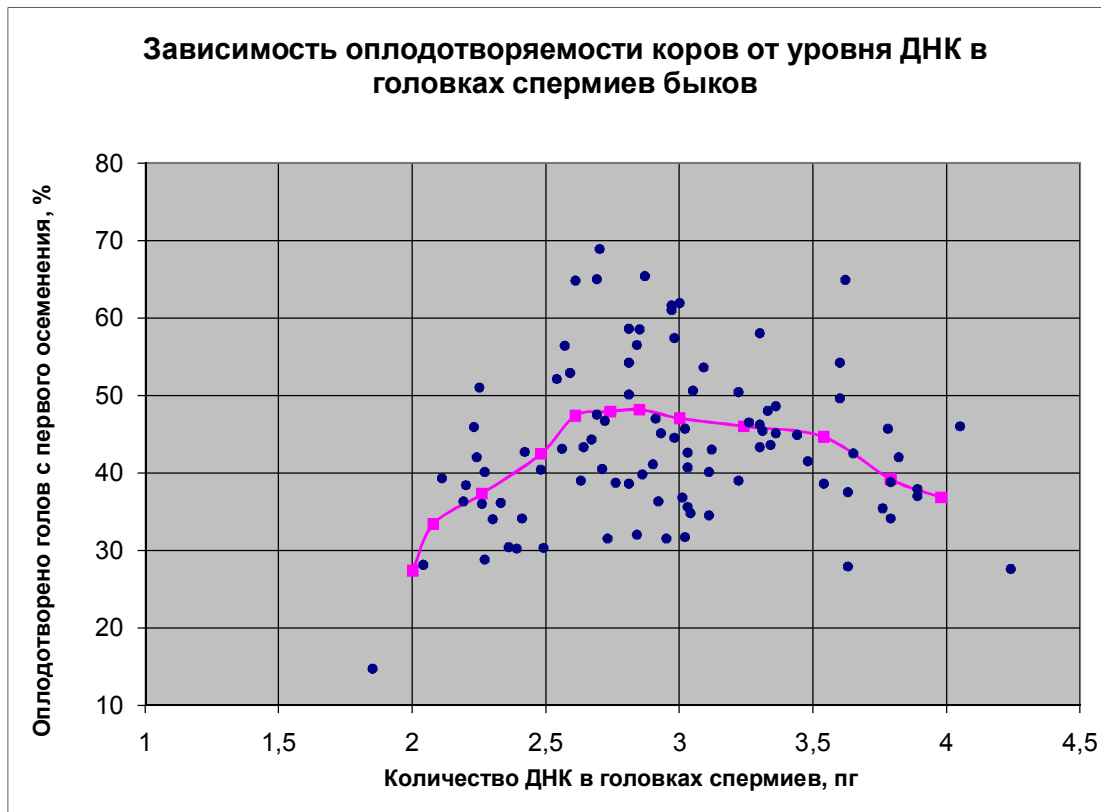


Рис. 5. Зависимость оплодотворяемости коров от уровня ДНК в головках спермиев быков.



Корреляционный анализ также показал, что при низких уровнях ДНК в спермиях (1,85 – 2,70 пг), оплодотворяющая способность быков растет с ростом уровня ДНК ($r=0,563\pm 0,157$). С дальнейшим ростом количества ДНК в головках спермиев, выше среднего уровня (2,94 пг), наблюдалось снижение оплодотворяющей способности. Оплодотворяемость коров достоверно снижалась с 47 % до 37 % в среднем с ростом количества ДНК в спермиях от 3,30 до 4,24 пг. Характер зависимости оплодотворяемости коров от количества ДНК в головках спермиев быков подобен нормальному распределению, с явно выраженной асимметрией в сторону больших значений ДНК.

Анализируя полученные результаты с точки зрения гипотезы о «лишней» или junk-ДНК можно оценить верхний предел «ненужной» ДНК в спермиях быков. Очевидно, что этот предел будет равен разности между наибольшим и наименьшим количеством ДНК в спермиях племенных быков. В нашем случае наименьшее количество ДНК в спермиях, обеспечивающее нормальную воспроизводительную способность быка, было равно 1,85 пг, а наибольшее – 4,24 пг. Таким образом, junk-ДНК в спермиях быков может быть около 2,39 пг или составлять 56,4 % от общего содержания ДНК [8].

Возможно ли, что некоторые наследственные признаки, например плодовитость животных, определяются нуклеотидными последовательностями в «лишней» ДНК? На рис. 6 указано соответствующими знаками содержание ДНК в

Зависимость оплодотворяемости коров от уровня ДНК в головках спермиев быков

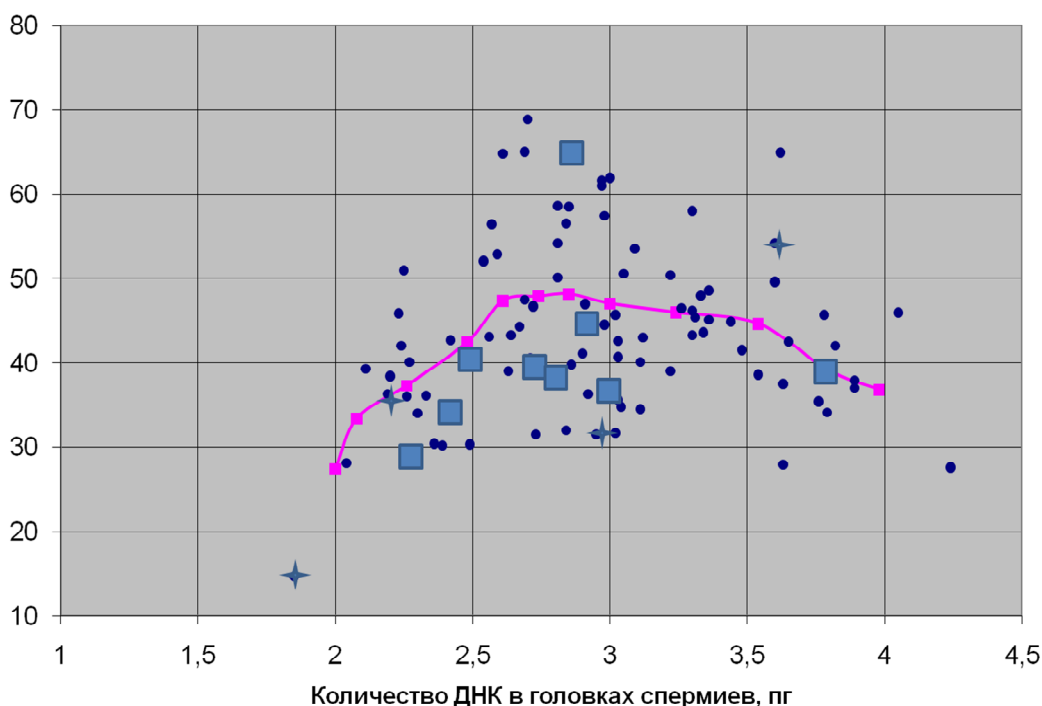


Рис. 6. Зависимость оплодотворяемости коров от уровня ДНК в головках спермиев быков линий Анас Адема (□) и Радониса (+).

спермиях быков – сводных братьев линий Аннас Адема (черно-пестрый скот) и Радониса (симментальский скот). Обращает на себя внимание тот факт, что сравнительно близкие родственники имеют широкие вариации как количества ДНК в головках спермиев, так и оплодотворяющей способности спермы. Таким образом,



половое размножение, сопровождающееся рекомбинацией нуклеотидных последовательностей ДНК в хромосомах, приводит к разбросу индивидуальных показателей наследственного материала во всем наблюдаемом диапазоне.

Присутствие излишней ДНК в спермиях, возможно, как-то связано с генотипическими и фенотипическими признаками животных и человека. Например, быки Консул-5354 и Льонк-5338, имеющие наименьшее количество ДНК в головках спермиев (1,85 пг и 2,27 пг, соответственно), имели и наименьшую живую массу (426 кг и 382 кг, соответственно). Для половозрелых быков исследуемых пород связь между живой массой животных и уровнем ДНК в спермиях представлена в таблице. Быки, имеющие большую массу тела, имели, как правило, и большее количество ДНК в спермиях, поэтому живая масса животных, возможно, определяется некоторыми нуклеотидными последовательностями в «теневого» ДНК.

Таблица

Соотношение между живой массой быков и количеством ДНК в спермиях

№	Порода	Число быков	Живая масса, кг	Количество ДНК в головках спермиев, пг
1	Симментальская	16	927	3,18±0,22
2	Черно-пестрая	16	860	2,82±0,21
3	Лебединская	8	847	2,91±0,19
4	Красно-степная	3	826	2,82±0,21
5	Айрширская	6	865	3,1±0,22
6	Монбельярдская	5	899	3,13±0,22
7	Шаролезская	1	994	2,63±0,14

Сухая масса головок спермиев пропорциональна количеству ДНК и, по нашим данным, коэффициент корреляции для этих показателей равен 0,690 (рис. 7). Линия тренда на рисунке указывает на линейную зависимость данных показателей, однако при сухой массе головок спермиев свыше 9 пг наблюдается отклонение от прямой пропорциональности, что, по-видимому, обусловлено более плотной упаковкой ДНК в «тяжелых» головках спермиев.

Для определения плодовитости животных, в некоторых случаях, достаточно, по-видимому, измерение количества сухого вещества в головках спермиев. Сухая масса головок спермиев, измеренная методом интерференционного однородного поля с большим раздвоением [1], для 129 исследованных быков в среднем равнялась 8,67 пг с рассеянием (дисперсией) от 7,61 до 9,93 пг; для 26 хряков – 8,78 пг (7,1 – 9,3 пг); для 12 баранов – 8,39 пг (7,4 – 8,9 пг); для 15 кобелей – 6,24 пг (5,3 – 7,2 пг); для 5 петухов – 2,59 пг (1,9 – 3,4 пг); для 6 индюков – 3,7 пг (2,4 – 4,6 пг); для 87 мужчин – 7,26 пг (5,8 – 8,7 пг). Средние показатели количества ДНК и сухой массы головок спермиев для каждого вида исследованных животных и мужчин, по нашему мнению, являются наиболее оптимальными величинами характеризующими высокую плодовитость самцов и оплодотворяющую способность спермы.

Вариабельность сухой массы головок спермиев также может характеризовать качество спермы. Результаты экспериментов показали, что в исследованных эякулятах быков коэффициенты вариаций сухой массы головок спермиев были в пределах от 2,6 % до 18,3 % и характеризовали качество спермы, поскольку, чем больше дефектов структуры клеток, чем выше вариабельность количественных



показателей, тем хуже сперма. Аналогичные закономерности наблюдались и для спермы других животных и человека.

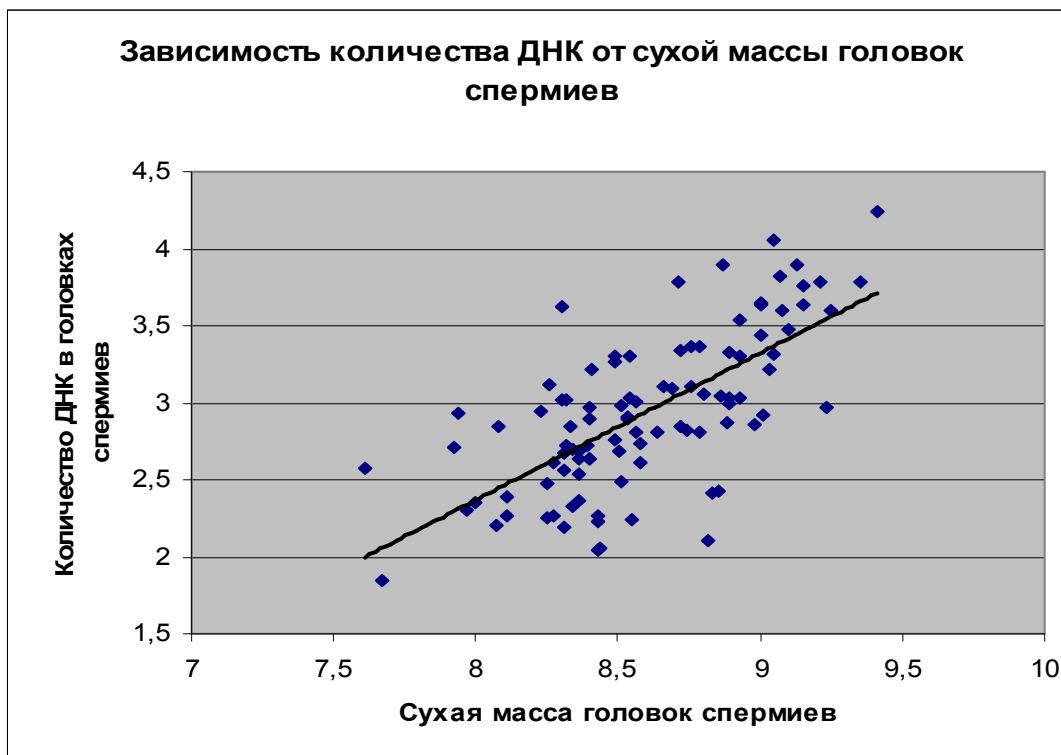


Рис. 7. Зависимость количества ДНК в головках спермиев от их сухой массы.

При облучении проб спермы электромагнитными волнами, лазерными лучами разных длин волн, подвижность спермиев повышалась в тех случаях, когда начальная активность спермы была пониженной по сравнению с нормой. Облучение спермы до замораживания не улучшало ни подвижности спермиев, ни их оплодотворяющей способности. Реабилитирующее действие лазерного и микроволнового излучений проявлялось при воздействии на размороженную сперму – эффект был более выражен для проб с низким качеством спермы [9]. Морфология спермиев после облучения не изменялась.

Выводы:

1. Методы интерференционной микроскопии позволяют изучать разнокачественность спермиев с хорошим разрешением и объективно оценивать качество спермы и состояние репродуктивной системы животных и человека.
2. Высокой плодовитостью обладали быки, в спермиях которых содержалось от 2,6 до 3,2 пг ДНК.
3. В спермиях быков может содержаться до 56 % и выше «мусорной» или junk-ДНК.

Библиографический список

1. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота. – К.: Аграрна наука, 1995. – 182 с.
2. Васильев В.С. Совершенствование методов интерференционной микроскопии для изучения спермы в зависимости от породы, возраста и плодовитости быков: Автореф. дис....канд.биол.наук: 03.00.13 / НИИЖ Лесостепи и Полесья УССР. – Харьков, – 1978. – 24 с.



3. Попадьян К.Ю. Только 10 процентов информации в геноме используется. Вести.гу: «Наука 2.0». 6.11.2010.
4. Васильев В.С. Эффективность селекции подвижных спермиев из эякулята человека в зависимости от их морфометрических показателей до и после воздействия гипотермии и криоконсервации при разных состояниях сперматогенеза / В.С.Васильев, Г.Г.Юрченко, М.Й.Крамар, Н.Н.Чуб, Л.И.Луцкая // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных: Сб. науч. тр. 17 / ХНАУ ; ХГЗВА. – Х., 2009. – С. 131 – 139.
5. Урбах В.Ю. Биометрические методы. – М., 1964. – 416 с.
6. Васильев В.С. Спермограмма как показатель качества спермы // Підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин: зб. наук. праць / ХНАУ; ХЗВИ. – Х., 2001. – 126 с.
7. Васильев В.С. Оценка количества «мусорной» ДНК в спермиях животных методами интерференционной микроскопии / В.С. Васильев, Я.П. Раковский, Н.Л. Лисиченко, А.А. Беликов // Науковий вісник НУБП України. – К., 2011. – Вип. 160, Ч.2. – С. 281–285.
8. Васильев В.С. и др. Количество ДНК в спермиях быков и оплодотворяемость коров / В.С.Васильев, А.М.Хохлов, О.В.Васильева // Досягнення і проблеми генетики, селекції та біотехнології: зб. наук. пр. / НАН України. – К. : Логос. – 2012. – С. 228–232.
9. Васильев В.С. Интерференционная микроскопия облученной спермы / В.С. Васильев, Л.И. Васильева, Н.Л. Лисиченко, М.Й. Крамар, Г.Г. Юрченко // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных: сб. науч. тр. 15 / ХНАУ; ХГЗВА. – Х., 2005. – С. 157–160.

КІЛЬКІСТЬ ДНК У СПЕРМІЯХ ТА ПЛОДЮЧІСТЬ ТВАРИН

Васильєв В.С., Харківська державна зооветеринарна академія

Досліджено морфо-функціональні показники сперміїв тварин і людини методами інтерференційної мікроскопії. Кількість ДНК у головках сперміїв дослідних бугаїв варіювала у межах від 1,85 до 4,24 пг. Найвищу плодючість мали ті бугаї, в яких у сперміях містилось від 2,7 до 2,9 пг. Суха маса голівок сперміїв биків у середньому дорівнює 8,67 пг, кнурів – 8,78 пг, баранів – 8,39 пг, кобелів – 6,24 пг, півнів – 2,59 пг, індиків – 3,7 пг, чоловіків – 7,26 пг. Junk-ДНК, можливо, становить до 56 % від всієї кількості ДНК.

Ключові слова: Junk-ДНК, спермії, інтерференційна мікроскопія, лазер.

QUANTITY OF DNA IN SPERM AND ANIMAL FERTILITY

V.S.Vasiliev, Kharkov State Zooveterinary Academy

Morphological and functional indicators of animal and human sperm were studied with use of microscopy interference method. The quantity of DNA in sperm of examined bulls varied from 1.85 to 4.24 pg. The bulls, whose sperm contained from 2.7 to 2.9 pg, were the most reproductive. Average value of dry mass sperms heads of bulls, boars, sheep, dogs, cocks, turkeys, men were accordingly 8.67 pg, 8.78 pg, 8.39 pg, 6.24 pg, 2.59 pg, 3.7 pg, 7.26 pg. Junk- DNA could amount to 56 % from the whole quantity of DNA.

Keywords: junk-DNA, sperm, microscopy interference, laser.