

БИОТЕХНОЛОГИЯ В МОЛОЧНОМ СКОТОВОДСТВЕ

Одним из основных методов совершенствования пород молочного скота в республике является искусственное осеменение с использованием высококлассных быков-производителей. На современном этапе имеющееся поголовье высокопродуктивных коров не обеспечивает полную потребность госплемпредприятий в быках-производителях. Ускорить процесс тиражирования коров с высокими параметрами продуктивности в сжатые сроки при традиционных методах размножения трудно. Используя метод трансплантации эмбрионов в селекционно-племенной работе открывается возможность ускоренного размножения генетически ценных животных по материнской линии.

В настоящее время технология трансплантации эмбрионов включена в долгосрочные племенные программы многих развитых стран мира по разведению, улучшению и сохранению существующих пород молочного скота. Принятый закон о племенном деле в животноводстве Республики Беларусь предусматривает через трансплантацию расширение объемов размножения крупного рогатого скота с высокими показателями продуктивности.

Углубленные исследования репродуктивной функции животных, ее возможная регуляция, микрохирургические манипуляции с зародышами показали, что метод трансплантации может являться основой ускоренного воспроизводства высокопродуктивных коров и целых популяций. Практическое применение этого метода в молочном скотоводстве обеспечивает интенсивное размножение животных с высокой генетической ценностью, ускоренное получение высокоценных племенных быков, матерями которых являются выдающиеся родоначальницы, способствует повышению эффективности племенной работы, оздоровлению стад от ряда заболеваний.

Мировой опыт свидетельствует, что трансплантация эмбрионов может ускорить селекционный прогресс в молочном скотоводстве в 6-7 раз по сравнению с обычными методами разведения. Метод трансплантации позволяет получать зародыши от одной самки 4-5 раз в год, вследствие чего очевидна реальная возможность ежегодного получения от коровы рекордистки до 10-30 и более телят. Это позволяет значительно ускорить ежегодный генетический прогресс в стаде путем интенсивного отбора, точности оценки матерей быков и племенного использования животных с высоким генетическим потенциалом.

Трансплантация эмбрионов позволяет быстро размножить импортируемые группы животных. Кроме того, ввозить зародыши гораздо дешевле, чем животных. Разработанная технология криоконсервирования эмбрионов обеспечивает длительное их хранение и создание криобанка зародышей выдающихся животных. В товарных стадах трансплантация эмбрионов дает возможность увеличения выхода телят за счет получения двоен от пересадки эмбрионов, а также производства телят мясных пород, используя молочных коров.

Технология трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота включает следующие этапы работы: отбор коров-доноров и реципиентов; вызывание суперовуляции у доноров; синхронизацию половых циклов доноров и реципиентов; искусственное

осеменение доноров; извлечение эмбрионов; оценку жизнеспособности зародышей; криоконсервирование эмбрионов; пересадку эмбрионов.

2.1. Отбор коров-доноров и реципиентов для трансплантации

Эффективность применения метода трансплантации эмбрионов во многом зависит от клинического и физиологического состояния коров, их способности реагировать на экзогенные гонадотропины и выделять достаточное число качественных зародышей. Следовательно, одним из наиболее существенных моментов в технологии трансплантации эмбрионов, способных повысить эффективность метода является отбор доноров и реципиентов.

Исходя из того, что донор – животное высокой племенной ценности, то первое, на что обращают внимание при их отборе - это молочная продуктивность, которая за ряд лактаций должна быть на 50-60% выше стандарта данной породы, а содержание жира в молоке - на 20% и более. Число учитываемых признаков может быть расширено в зависимости от поставленных селекционных целей. Например, содержание белка в молоке, пригодность к машинному доению (форма вымени, скорость молокоотдачи), крепость конституции, экстерьер и т.д. Племенная ценность донора, наряду с оценкой собственного генотипа, должна подтверждаться продуктивностью родителей. Коровы-доноры должны иметь известное происхождение, подтвержденное документально по системам групп крови. В большинстве случаев в качестве доноров используют лактирующих или выбракованных коров (не связанных с гинекологической патологией), в возрасте от 4 до 8 лет, живой массой 500-650 кг, с удоем по наивысшей лактации не ниже 7 тыс. кг молока, жирностью 3,7% и более.

Не менее важным, а может и определяющим фактором при отборе доноров является состояние репродуктивных органов. Поэтому для гормональной обработки следует отбирать животных не ранее, чем через 2,5-3 месяца после отела. При этом уменьшение размеров матки до физиологически необходимых размеров не может служить гарантией готовности давать эмбрионы высокого качества. Такой гарантией может быть только проведение клинического обследования предполагаемого донора, которое при необходимости дает возможность определить направление восстановления функций размножения на основе экзогенной гормонотерапии.

Целесообразно проводить разовую индукцию полиовуляции потенциальных доноров с целью выяснения ответной реакции яичников на введение гонадотропина, после чего делается окончательное заключение о пригодности животного к использованию в технологии трансплантации. Коровы и телки с положительной ответной суперовулирующей реакцией (10 и более овуляций) и давшие не менее 4-х жизнеспособных эмбриона за первую обработку переводятся в группу постоянных доноров.

Оптимальный интервал между повторными обработками животных - 60-70 дней, в этом случае от донора можно извлекать эмбрионы до 5 раз в год. В технологии трансплантации эмбрионов коров-доноров с уровнем реакции полиовуляции до 6 желтых тел можно использовать повторно через 35-45 дней.

Дополнительными критериями отбора животных для трансплантации эмбрионов являются гормональный статус и метаболическая активность потенциальных доноров. Для получения от донора не менее 10 овуляций и 6 жизнеспособных эмбрионов необходимо, чтобы в крови коров содержание эстрадиола было на уровне 15,4 пг/мл, тестостерона – 0,18 нг/мл, ЛГ – 1,46 МЕ/л на 0-й день полового цикла, а также прогестерона – от 2,0 до 5,0 нг/мл (в среднем 3,55) и ЛГ – 1,54 МЕ/л на 10-й день полового цикла. Вызывание суперовуляции может быть эффективным при содержании в крови холестерина не менее 3,55 ммоль/л, β -каротина – 8,88 мкмоль/л, витамина А – 4,36 мкмоль/л, активность аланинаминотрансферазы не ниже 0,24 мкмоль/л.

В качестве реципиентов используются телки случного возраста (16-18 месяцев) не представляющие племенной ценности, живой массой 380-400 кг. Не рекомендуется использовать телок с низкой живой массой.

Реципиенты должны быть клинически здоровы, внутренние и наружные половые органы хорошо развиты, половой цикл должен соответствовать физиологическим параметрам. При ректальном исследовании матка и яичники реципиента должны находиться в тазовой полости. Шейка матки должна быть четко выражена, длиной 7-12 см, диаметром 2,5-3,0 см. Длина рогов матки от 20 до 35 см. Яичники должны иметь округлую или овальную форму, плотную консистенцию, размер 3х2 см у коров и 2,0х1,5 см у телок.

Исследованиями выявлена зависимость приживляемости зародышей от морфофункционального состояния органов воспроизведения реципиентов. У телок-реципиентов с нормально развитой половой системой уровень стельности в среднем составляет 57%, в то время как при отклонениях в развитии половой системы - 20%.

При отборе потенциальных реципиентов следует также учитывать параметры половой цикличности. В качестве реципиентов следует использовать телок с продолжительностью полового цикла 19-22 дня, поскольку у животных с менее (16-18) или более (23-26 дней) продолжительным циклом отмечено достоверное снижение приживляемости зародышей на 15-20%.

Важным условием высокой приживляемости эмбрионов является синхронность в проявлении эструса у донора и реципиента, а также своевременное и квалифицированное выявление животных в охоте. Наиболее результативным (по приживляемости эмбрионов - 58%) является синхронное проявление охоты у донора и реципиента по времени с разностью $\pm$ 12 часов. При этом наблюдение за поведением животных следует проводить 3 раза в сутки: утром, днем и вечером по 1 часу. Это позволяет выявить до 90-95% реципиентов в охоте.

При отборе потенциальных реципиентов для трансплантации существенное значение имеет определение качества желтого тела животного. Если на яичнике реципиента пальпируется желтое тело отличного качества (размер 1,0-1,5 см, выступает над поверхностью яичника, имеет грибовидную форму) или хорошего качества (размер 0,7-1,0 см, округлая или грибовидная форма), то уровень приживляемости зародышей составляет 53-57%. При удовлетворительном желтом теле (размер 0,5 см, округлая форма) уровень стельности находится в пределах 28-30%. Не рекомендуется использовать для пересадки

эмбриона реципиента, на яичниках которого имеется одновременно желтое тело и фолликул до 1,0 см.

Для более объективной оценки функциональной активности яичников и снижения эмбриональной смертности при трансплантации, наряду с диагностированием качества желтых тел, следует проводить определение концентрации стероидных гормонов и биохимических показателей крови реципиентов на 6-7 день естественного или индуцированного полового цикла.

Пересадку эмбрионов следует проводить реципиентам, независимо от качества желтого тела, с уровнем прогестерона в крови от 2,0 до 4,9 нг/мл. Соотношение прогестерона к эстрадиолу должно быть 1:10. В случае использования телок в качестве реципиентов с уровнем прогестерона свыше 5 нг/мл приживляемость снижается на 10-17%, а с уровнем ниже 2,0 нг/мл - на 25-30%. Содержание холестерина должно быть в пределах от 2,60-3,90 ммоль/л, β -каротин – 12,2-17,3 мкмоль/л.

Для получения двойных отелов в качестве реципиентов необходимо использовать половозрелых коров после 2-4 отелов, живой массой 550-650 кг. При проявлении признаков половой охоты параллельно проводится искусственное осеменение и коров-доноров, и реципиентов. На 7-8 день после осеменения коров ректально исследуют на пригодность к использованию в качестве реципиента и, в случае наличия в яичнике желтого тела, животным пересаживают один эмбрион в контрлатеральный рог матки (т.е. в противоположный рог, смежный с яичником, имеющему желтое тело).

После ветеринарных обработок коров и телок для трансплантации эмбрионов их можно использовать только через 3 недели. На каждого донора следует готовить 5-6 реципиентов.

Диагностика стельности реципиентов проводится ректальным методом спустя 2-3 месяца после эмбриопересадок.

Кормление доноров и реципиентов должно быть биологически полноценным. Недостаточный уровень кормления, несбалансированность рациона по общей питательности и другим жизненно важным элементам, использование кормов низкого качества ведут к нарушению обмена веществ, что оказывает отрицательное влияние на эффективность гормонального вызывания суперовуляции, качество полученных эмбрионов и их приживляемость.

2.2. Вызывание суперовуляции у коров-доноров

Для вызывания суперовуляции у крупного рогатого скота используются гонадотропные препараты (гонадотропин сыворотки жеребых кобыл - ГСЖК и фолликулостимулирующий гормон - ФСГ - гипофиза животных), для синхронизации половых циклов - аналоги простагландина Ф2-альфа (эстрофан, магэстрофан, клопростенол, суперфан, ремофан, клатрапростин, эстуфалан и др.). Препараты ГСЖК обладают комплексной фолликулостимулирующей и лютеинизирующей активностью. Период полураспада экзогенного ГСЖК у коров составляет около 6 дней. Соотношение ФСГ и ЛГ в различных партиях неодинаковое, что сказывается на результативности суперовуляции. Стимуляция роста фолликулов препаратами ГСЖК

сопровождается, как правило, увеличением массы яичников, образованием после овуляции разного числа и величины желтых тел. Из-за длительного распада ГСЖК в крови животных накапливаются повышенные концентрации гормонов. Изменение эндокринного статуса при индукции суперовуляции может оказывать неблагоприятное действие на оплодотворяемость яйцеклеток, развитие зародышей, а также на физиологическое состояние половых органов (в частности, наблюдается кистозное перерождение яичников). Для исключения длительной стимуляции роста фолликулов применяется анти-ГСЖК. Обработка антисывороткой в день проявления охоты нейтрализует циркулирующую в крови животных ГСЖК и тем самым прекращает дальнейшую стимуляцию роста фолликулов в яичниках. Это создает более благоприятный фон для овуляции, оплодотворяемости яйцеклеток и последующего развития зародышей. В практике используются стандартные гонадотропные препараты высокой степени очистки: сергон (Чехия), фоллигон (Голландия), прегмагон (Германия). Эти препараты инъецируют донорам на 11-12-ый день полового цикла, однократно, в дозе 50 И.Е. на 100 кг живой массы животного. Применение этих гонадотропинов обеспечивает вызывание множественной овуляции у 75-78% животных и получение в среднем 3,5-4,0 жизнеспособных эмбриона на донора.

Для вызывания суперовуляции у коров используются также гипофизарные препараты. Основное физиологическое действие фолликулостимулирующих гормонов заключается в стимуляции роста и созревания фолликулов яичника, образования фолликулярных гормонов (эстрагенов), регулирующих процесс течки. Лютеинизирующий гормон совместно с фолликулостимулирующим вызывает овуляцию и стимулирует образование желтого тела. Желтое тело само выполняет функцию гормональной железы и вырабатывает гормон прогестерон, который обеспечивает сохранение беременности. В практике используются гипофизарные препараты производства США (ФСГ-п), России (ФСГ-супер), Чехии (фолликотропин), Литвы (фоллитропин) и др.

В отличие от ГСЖК, препараты ФСГ вводятся многократно, так как период полураспада ФСГ очень короткий (5-6 ч). Применение ФСГ в сочетании с простагландинами обеспечивает получение 5-6 жизнеспособных эмбрионов и 10-12 овуляций на донора.

Оптимальными параметрами использования гипофизарных гонадотропинов являются: доза ФСГ-п – 40-50 мг, ФСГ-супер – 50А.Е., фолликотропина – 480 М.Е., фоллитропина – 1200 ЕД; начало экзогенного введения 10-12-ый день полового цикла; инъекция аналога простагландина F2-α на 3-й день от начала обработки в дозе 750 мкг.

Опыт работы по вызыванию суперовуляции у коров-доноров сывороточными и гипофизарными препаратами показал, что при использовании гипофизарных гормонов (ФСГ-п, ФСГ-супер, фолликотропин, фоллитропин) получают более стабильные и высокие результаты суперовуляции и эмбриопродукции (табл. 3). Так, процент коров-доноров, реагирующих на обработку сывороточными гонадотропинами, составил 75,0-78,3%, гипофизарными препаратами – 85,3-88,8%, число овуляций на донора – соответственно 8,3-9,7 и 10,2-12,0, количество пригодных эмбрионов – 3,5-4,0 и 5,5-6,1.

Залогом эффективного применения метода трансплантации эмбрионов в практике племенной работы являются высокие

показатели овулирующей реакции яичников коров-доноров на гонадотропные обработки и выход достаточного числа качественных эмбрионов. Высокая вариабельность и непредсказуемость как по числу вызванных овуляций, так и по количественному и качественному составу извлеченных зародышей создают трудности в планировании программы пересадок эмбрионов реципиентам и ведут к повышению затрат на трансплантацию.

В связи с этим, для совершенствования схем индукции полиовуляции у коров-доноров требуется изыскания новых подходов к решению этой проблемы, разработки эффективных препаратов, позволяющих получать хорошие результаты по выходу эмбрионов.

Изучена эффективность гонадотропина ФСГ-Б, полученного в лаборатории генетики БелНИИЖ, и рекомендуется для практики следующая схема его применения: начало гормональной обработки 10-12-й день полового цикла; суммарная доза – 1500-1650 ИЕ на одного донора; инъекция простагландина F2-α на 3-й день обработки в дозе 750 мкг.

Инъекция гонадотропина ФСГ-Б по предложенной схеме позволяет получать в среднем на донора 10-11 овуляций, 7,2-8,1 эмбриона, в том числе 5,2-5,5 полноценных.

Таблица 3

Результаты суперовуляции и эмбриопродукции доноров при использовании разных гонадотропинов

Показатели	Гормональные препараты					
	Сывороточные		Гипофизарные			
	Фоллигон	Прегмагон	ФСГ-п	ФСГ-супер	Фолликотропин	Фоллитропин
Обработано животных, n	100	60	150	75	30	135
Реагировало полиовуляцией, n	75	47	128	64	26	120
Процент от числа обработанных	75,0	78,3	85,3	85,3	86,6	88,8
Среднее число овуляций на донора, n	9,7±	8,3±	10,2±	11,0±	12,0±	10,3±
	0,70	0,64	1,02	0,93	1,23	0,53
Количество положительных по извлечению доноров, n	57	38	122	60	23	108

Процент от числа реагирующих полиовуляцией	76,0	80,8	95,5	93,7	88,5	90,0
Получено эмбрионов на донора, n	6,3± 0,79	6,5± 0,83	7,8± 0,96	7,4± 0,73	8,0± 1,04	8,0
в т.ч.: пригодных к пересадке	3,5± 0,52	4,0± 0,50	5,7± ** 0,61	5,5± ** 0,67	5,6± * 0,56	6,1± *** 0,64
дегенерированных	2,1± 0,37	1,7± 0,41	1,6± 0,34	1,5± 0,36	1,8± 0,47	1,4± 0,52
яйцеклеток	0,7± 0,19	0,8± 0,24	0,5± 0,14	0,4± 0,11	0,6± 0,17	0,5± 0,21
Выход полноценных эмбрионов от числа извлеченных, %	55,5	61,5	73,0	74,3	70,0	76,2

Здесь и далее: $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$

В то же время использование вышеперечисленных гонадотропинов при индукции полиовуляции не исключают образования на яичниках неовулировавших фолликулов, наличие которых может привести к нарушениям гормонального статуса доноров. С целью исключения длительной стимуляции роста фолликулов и наступления равномерной овуляции рекомендуется использовать синтетические аналоги гонадотропин рилизинг-гормона (Гн-РГ). Инъекция донору Гн-РГ (сурфагон, диригистран и др.) в день охоты способствует выделению лютеинизирующего гормона и овуляции фолликулов в фиксированное время.

Многолетний опыт нашей работы показал, что инъекция Гн-РГ в 2-3 раза снижает число неовулировавших фолликулов, повышает на 6-9% количество овуляций и на 11-19% число эмбрионов, пригодных к пересадке, в расчете на одного донора.

2.3. Синхронизация половых циклов доноров и реципиентов

Синхронность проявления эструса между донором и реципиентом - важнейшее условие высокой приживляемости

эмбрионов. Для синхронизации охоты используют простагландин ПГФ2-альфа или его синтетические аналоги (эстрофан, магэстрофан, ремофан, клопростенол, клатрапростин, суперфан, эстуфалан и др.).

По технологии трансплантации на каждого донора следует подготавливать не менее 5 реципиентов, причем день охоты реципиента должен совпадать с днем первого осеменения суперовулирующего донора. В случае использования в технологии трансплантации постоянных доноров (проверенных на гормональную обработку и имевших стабильный выход качественных эмбрионов) число реципиентов можно увеличить до 10.

Перед гормональной обработкой животных исследуют ректально (определяют размеры и форму яичников, наличие и выраженность желтого тела). Лютеиновая фаза цикла соответствует оптимальному времени для инъекции препаратов. Простагландины вводят внутримышечно в дозах, указанных в наставлениях по их применению. Как правило, животные приходят в охоту через 48-72 часа после инъекции препарата. Не пришедших в охоту животных обрабатывают повторно через 10-11 дней с момента первого введения ПГФ2-альфа. Двукратное введение препарата (в любую фазу полового цикла) с 10-ти дневным интервалом эффективно использовать на большом поголовье доноров и реципиентов, так как это способствует увеличению числа животных, проявивших признаки половой охоты, и снижает трудоемкость операций обслуживающего персонала.

Эффективен способ синхронизации эструса у доноров и реципиентов путем комплексного использования в лютеиновой фазе полового цикла инъекций гонадотропина с простагландином $\text{Ф2}\alpha$ и гонадотропин релизинг-гормоном. Животных, имеющих хорошо выраженное желтое тело, обрабатывают ФСГ-супер в общей дозе 10 Арм.ед. для телок и 15 Арм.ед. для коров двукратно по 5-7,5 Арм.ед. через 12 часов, на следующий день однократно инъецируют эстрофан по 500 мкг, а через 60 часов от момента введения эстрофана дополнительно сурфагон по 25 мкг. Половая охота у животных проявляется на 2-3 сутки после введения простагландина.

Следует учитывать, что данные обработки осуществляются не параллельно: доноров обрабатывают за 15 дней до начала стимулирования суперовуляции, а реципиентов – на второй день после начала стимулирования суперовуляции у доноров.

Исследованиями установлено (*табл. 4*), что комплексное использование гормональных препаратов ФСГ, ПГФ2альфа Гн-РГ для синхронизации эструса у самок крупного рогатого скота существенно повышает эффективность работ по трансплантации. Из 50 телок, обработанных в опыте, клинически выраженную охоту проявили 88% животных, что на 11,4% больше, чем в контроле, а число реципиентов, пригодных для эмбриотрансплантации, и приживляемость пересаженных зародышей увеличилась соответственно на 15,0 и 12,2%.

Таблица 4

Эффективность способов подготовки животных для эмбриотрансплантации

Показатели	Группы животных			
	Телки-реципиенты		Коровы-доноры	
	I - опыт	II - контроль	III - опыт	IV - контроль
Обработано животных, п	50	60	20	20
Проявили охоту, п/%	44/88,0	46/76,6	18/90	15/75
Количество животных, пригодных для эмбриотрансплантации, п/%	40/91,0	35/76,0	16/88,8	11/73,3
Число эмбриопересадок, п	40	35	-	-
Стельных реципиентов, п/%	22/55,0	15/42,8	-	-
Реагировало суперовуляцией доноров, п/%	-	-	14/87,5	8/72,7
Число овуляций на донора, п	-	-	9,6± 0,91	9,4± 0,97
Получено эмбрионов всего, п	-	-	7,7± 0,89	7,6± 0,81
в том числе: пригодных	-	-	6,2± 0,45*	5,0± 0,43
дегенерированных	-	-	2,0± 0,54	1,9± 0,50
яйцеклеток	-	-	0,5± 0,11	0,7± 0,17
Выход полноценных эмбрионов, %	-	-	80,5	65,7

Аналогичная закономерность наблюдалась по группе коров-доноров. Количество животных, пригодных для использования в качестве доноров, увеличилось на 15,5, а число коров, положительно реагирующих полиовуляцией, на – 14,8%. В опытной группе по сравнению с контрольной повысился выход полноценных эмбрионов от донора на 24% ($P \leq 0,05$), а выход зародышей, пригодных для пересадки, от общего числа извлеченных зародышей – 14,7%.

Таким образом, комплексное использование гормональных препаратов для синхронизации эструса самок крупного рогатого скота позволяет повысить количество телок-реципиентов и коров-доноров, пригодных для эмбриотрансплантации, соответственно на 15 и 15,5%, уровень приживляемости зародышей – на 12,2%, выход полноценных эмбрионов от числа извлеченных – на 14,7%.

2.4. Искусственное осеменение коров-доноров

Эффективность искусственного осеменения коров-доноров в суперовулирующую охоту во многом зависит от правильности выбора оптимального времени для осеменения коров с учетом таких особенностей эструса, как проявление течки, ее интенсивность и длительность, общая реакция возбуждения, охоты и овуляции, качество используемой спермы быков-

производителей, а также строгого соблюдения ветеринарно-санитарных требований при выполнении работ.

Течка у коров характеризуется набуханием и покраснением слизистых преддверия влагалища и шейки матки, выделением слизи из половых органов. Длительность течки составляет от 2 до 6 суток. Через 24-36 часов после начала течки наступает общее возбуждение, животное теряет аппетит, снижает удой, становится беспокойным, прыгает на других животных. Через 6-12 часов, после того как у коровы появились признаки возбуждения, наступает охота, которая продолжается 12-18 часов.

У мясного скота продолжительность течки колеблется в пределах от 21 до 44 часов, охота длится от 7 до 12 часов, овуляция наступает через 20-25 часов от начала и 10-15 часов после окончания охоты.

Выявление животных в охоте проводят не реже трех раз в день при активных прогулках или пастбище. В суперовулирующий цикл 60-70% коров приходит в охоту утром, 10% - в полдень и 20-30% вечером. Продолжительность каждого наблюдения составляет 1-2 часа. Охоту считают установленной, если корова не менее двух раз подряд проявила рефлекс неподвижности.

При осеменении необходимо учитывать тот факт, что овуляция наступает через 10-15 часов после окончания охоты, а яйцеклетки при выходе из фолликулов в рог матки способны сохранять жизнеспособность только в течение 5-6 часов, поэтому осеменять коров следует перед овуляцией, как можно ближе к ее началу.

Сроки осеменения коров можно определить и ректально. За 6-12 часов до овуляции в яичнике присутствует зрелый фолликул, представляющий собой пузырек размером 1,5-1,8 см, при осторожном надавливании на который ощущается зыбление.

Осеменение доноров осуществляют ректоцервикальным способом, позволяющим контролировать состояние половых органов самки, дважды в день двойной дозой спермы в тело матки с применением стерильных инструментов одноразового пользования. В каждой дозе должно быть не менее 30 млн. подвижных спермиев. Первое осеменение проводят после установления охоты, второе - через 10-12 часов. При необходимости (длительная охота) осеменение повторяют 3-4 раза. Используется только сперма с высокой оплодотворяющей способностью и хорошего качества. Иногда для повышения результативности осеменения используется семя двух быков. Достоверно не известны причины этого. Однако существует мнение, что происходит отбор наиболее жизнеспособных мужских гамет, обладающих высокой оплодотворяющей способностью.

При введении инструмента в цервикальный канал сперму следует впрыскивать медленным нажатием на поршень катетера, распределяя ее равномерно на протяжении всего канала шейки матки. Допускается легкий массаж шейки и рогов матки. Для большинства животных мясного скота характерен легковозбудимый тип нервной деятельности. Поэтому, при искусственном осеменении следует создавать спокойную обстановку с целью снятия стрессового воздействия на животное. В случае если

донор ведет себя беспокойно, проводят внутримышечную инъекцию 2%-го аминазина из расчета 0,05 г на 100 кг живой массы. После осеменения коров-доноров необходимо выдержать в стойле до прекращения признаков охоты.

Искусственное осеменение коров-доноров в суперовулирующую охоту является одним из важных факторов, который оказывает влияние на оплодотворяемость яйцеклеток и выход полноценных эмбрионов. Поэтому в этот период за донорами должен вестись строгий контроль для того чтобы четко определить начало охоты и ее продолжительность. Нашими исследованиями было установлено, что кратность осеменения оказывает положительное влияние на эмбриопродуктивность коров-доноров (табл. 5). Оплодотворяемость яйцеклеток при трехкратном осеменении, при этом увеличивается на 6,0%, а выход полноценных зародышей, в расчете на одного донора на – 1,2 эмбриона.

Таблица 5

Оплодотворяемость яйцеклеток, количество и качество эмбрионов у коров-доноров в зависимости от кратности их осеменения

<i>Показатели</i>	<i>Количество осеменений</i>	
	<i>два</i>	<i>три</i>
Число коров-доноров, n	25	25
Реагировало полиовуляцией, n/%	21/84,0	22/88,0
Среднее число овуляций на донора, n	11,2± 0,93	11,8± 1,08
Положительных по извлечению доноров, n/%	21/100	21/95,4
Извлечено зародышей на положительного донора, n	7,0± 0,75	7,6± 0,98
из них: пригодных к пересадке	4,6± 0,63	5,8± 0,54
дегенерированных	1,7± 0,50	1,5± 0,48
неоплодотворенных яйцеклеток	0,7± 0,21	0,3± 0,14
Оплодотворяемость яйцеклеток, %	90,0	96,0

2.5. Контроль реакции яичников

Контроль реакции яичников проводится с целью определения готовности донора к извлечению эмбрионов, а также для ориентировочного определения возможного количества эмбрионов, что дает возможность вести контроль за качеством извлечения и планировать дальнейшую работу. Подсчет желтых тел и фолликулов у доноров проводят непосредственно перед извлечением эмбрионов путем ректальной пальпации яичников. При этом следует учитывать, что полноценное

желтое тело представляет собой бугорок грибовидной формы с углублением в центре и твердый на ощупь. Фолликулы не так резко выступают над яичником, округлые по форме. При пальпации чувствуется флуктуация фолликулярной жидкости. У доноров, у которых желтые тела отсутствуют или их насчитывается не более двух, извлечение эмбрионов не проводят.

2.6. Нехирургическое извлечение эмбрионов

Техника нехирургического извлечения эмбрионов включает предварительную оценку половых органов донора (наличие и подсчет желтых тел на каждом из яичников, определение состояния матки и размеров ее рогов). Эмбрионы извлекают на 7-й день после осеменения суперовулирующих доноров. Перед извлечением эмбрионов животное фиксируют в станке, прямую кишку освобождают от фекальных масс. Наружные половые органы и перинеальную область тщательно моют теплой водой с мылом, осушают салфеткой, а затем дезинфицируют специальными аэрозолями. Эпидурально вводят 5-7 мл 2%-го раствора новокаина для предотвращения акта дефекации и снятия напряжения гладкой мускулатуры прямой кишки. Строптивым коровам вводят внутримышечно 10-15 мл аминазина с целью снятия стресса.

В качестве промывной жидкости используется фосфатно-буферный раствор (среда Дюльбекко) в объеме 1000 мл.

После введения катетера промывная среда в рог матки подается порциями (по 50-60 см³). После ее подачи рог матки поднимают за верхушку, осторожно оттягивают вдоль брюшной полости и слегка массируют. В этот период промывная среда через отверстие в катетере поступает внутрь его и самотеком попадает в стерильный цилиндр для сбора жидкости. Эту процедуру выполняют 8-10 раз. Обычно на промывание одного рога матки нужно 500 мл среды. Процесс извлечения эмбрионов контролируется ректально.

Для извлечения эмбрионов используется два вида инструментов: двухканальные катетеры фирмы “Нойштадт” (Германия) и трехканальные фирмы “Кассу” (Франция).

Для работы в условиях фермы Белорусским НИИ животноводства предложена закрытая система извлечения эмбрионов на основе двухканальных инструментов (табл. 6).

Таблица 6

Результаты извлечения эмбрионов в зависимости от используемого инструмента

Показатели	Используемый инструмент		
	Модель “Нойштадт”	Закрытая система БелНИИЖ	Модель “Кассу”

Оперировано животных, гол.	39	34	32
Положительных по извлечению доноров, гол.	37	34	29
Процент от числа оперированных	94,8	100	90,6
Среднее число овуляций на донора, n	9,3± 0,89	10,2± 1,01	9,1± 0,96
Среднее число извлеченных эмбрионов на донора, n	6,5± 0,74	8,6± 0,63*	6,6± 0,67
Процент извлечения от числа овуляций	69,9	84,3	72,5

Закрытая система извлечения эмбрионов нехирургическим методом на основе двухканального катетера позволяет изолировать промывную среду от воздуха помещения. Вследствие этого уменьшается бактериальная обсемененность среды, увеличивается производительность труда, сокращается время на извлечение эмбрионов. При использовании данной системы выход эмбрионов от числа желтых тел увеличивается на 14,3% по сравнению с применением катетера фирмы “Нойштадт” и на 11,8% при работе с трехканальным катетером фирмы “Кассу”.

2.7. Оценка качества эмбрионов, их кратковременное культивирование

Оценку биологической полноценности эмбрионов крупного рогатого скота можно проводить несколькими методами: морфологически, с использованием фитальных красителей, культивированием. Наибольшее распространение получил морфологический метод. Установлено, что результаты имплантации зародышей зависят от того, насколько полно оценена их жизнеспособность. Работу с эмбрионами проводят в стерильных условиях в специальном помещении - боксе при температуре воздуха + 22 - +25°C.

Основными критериями, по которым производится оценка качества эмбрионов, являются: определение стадии их развития, соответствие уровня дробления возрасту от оплодотворения до извлечения, целостность и форма оболочки, размеры бластомеров и связь между ними. Биологически полноценными считаются эмбрионы, имеющие правильную шарообразную форму, гомогенную светлую цитоплазму, прозрачную неповрежденную оболочку, одинакового размера бластомеры с плотным межклеточным контактом. Пригодные к пересадке эмбрионы на 7-8-й день после осеменения соответствуют стадиям развития: ранняя и поздняя морула, ранняя и поздняя бластоциста. Для ранней морулы характерно наличие 16-32 бластомеров. Бластомеры разной величины, набухшие, перивителлиновое пространство свободно от отдельных бластомеров. У поздней морулы число бластомеров увеличивается до 32-64. Краевые бластомеры равной величины, завершено уплотнение между бластомерами, отсутствуют разрывы связей между ними.

Для ранней бластоцисты характерно наличие 64-130 бластомеров. На этой стадии образуются трофобласт и бластополость. Перивителлиновое пространство еще различается. Поздняя бластоциста имеет более 130 бластомеров с четко выраженной бластополостью. Эмбриобласт локализован и отчетливо виден. Трофобласт непрерывный. Зона пеллюцида утончена. Перивителлиновое пространство отсутствует.

Эмбрионы с асинхронным дроблением, с бластомерами разной величины, с повреждением прозрачной оболочки, с лизисом бластомеров и нарушением связи между ними, а также с агглютинацией (разрушением) цитоплазмы, множественными включениями в перивителлиновом пространстве не пригодны для трансплантации. Для неоплодотворенной яйцеклетки характерна однородность клеточной массы, округлая форма, отсутствие бластомеров.

Для морфологической оценки качества морул и бластоцист рекомендуется 5-ти бальная шкала: отличные - эмбрионы сферической формы, стадия развития соответствует возрасту, зародышевые клетки однородные по размеру и цвету; хорошие - эмбрионы соответствуют стадии развития, но имеются небольшие отклонения: неправильная форма, наличие незначительных включений в перивителлиновом пространстве, выделение одного или нескольких бластомеров, увеличение перивителлинового пространства; удовлетворительные - эмбрионы имеют клетки со структурными отклонениями, деформированные бластомеры, в перивителлиновом пространстве мертвые клетки; условно-годные - эмбрионы с деформированной прозрачной оболочкой, частичным разрушением бластомеров, нарушением связи между ними, фрагментацией цитоплазмы, сжатием бластомеров; неудовлетворительные – эмбрионы, отстающие в развитии, со структурными нарушениями, имеющие клетки разного размера, дефекты прозрачной оболочки (сколы, трещины), содержат включения в перивителлиновом пространстве.

Манипуляции с эмбрионами с момента их получения до пересадки или криоконсервирования занимают от одного до семи часов. В течение этого времени необходимо создать условия, обеспечивающие сохранение жизнеспособности эмбрионов. Кроме того, продолжение развития зародышей при кратковременном культивировании является дополнительным тестом в их морфологической оценке.

Культивирование эмбрионов проводят в часовых стеклах в 0,5-1,0 мл культуральной среды, помещенных в чашки Петри, в термостате при +37°C во влажной атмосфере и при постоянном составе газовой среды (90% азота, 5% кислорода и 5% углекислого газа). После чего их оценивают на пригодность к пересадке. Эмбрионы, пригодные к эмбриопересадке, помещают в специальные пайетты с помощью микроаспиратора по схеме: среда для культивирования (2,5-3,0 см) - воздушный пузырек - (0,5-0,7 см) - эмбрион со средой (2,0-3,0 см) - воздушный пузырек (0,5-0,7 см) - среда для культивирования (2,5-3,0 см). Пайетта готова для пересадки. Для транспортировки на большие расстояния свежеполученные эмбрионы заправляют в пайетты, помещают в специальный контейнер (конструкции БелНИИЖ). В таком состоянии зародыши сохраняют жизнеспособность до 24 часов.

2.8. Нехирургическая пересадка эмбрионов

Нехирургическая пересадка эмбрионов состоит в основном из трех этапов: подготовки реципиентов к пересадке эмбрионов; пересадки, включающей прохождение с помощью специальных катетеров внутренней полости половых органов от преддверия влагалища до верхушки рога матки; строгого контроля за реципиентом до установления стельности или до выявления охоты. Основным критерием эффективности применения метода трансплантации эмбрионов является их

приживляемость после нехирургической пересадки. Этот показатель во многом зависит от качества самих эмбрионов, степени синхронности проявления эструса между донором и реципиентом, квалификации специалиста и условий выполнения работы по пересадке.

В работе для нехирургической пересадки эмбрионов используют катетеры производства фирмы “Нойштадт” и “Кассу”.

Пересадка эмбрионов проводится в период диэструса (7-8-й день). В этот период матка наиболее восприимчива к инфекции. Поэтому при пересадке необходимо строго соблюдать асептику. У реципиента должно быть четко выраженное желтое тело, качество которого определяется непосредственно перед пересадкой и оценивается по трехбалльной шкале: "отличное", "хорошее", "удовлетворительное". Животные, у которых желтые тела отсутствуют или слабо выражены, исключают из числа реципиентов и используют в технологии искусственного осеменения.

Эмбрион, заправленный в пайетту, помещают в стерильный катетер для пересадки, на который надевают полиэтиленовый санитарный чехол. Подготовленный таким образом к пересадке инструмент вводят во влагалище (под углом 45°) до шейки матки. Санитарный чехол прорывают катетером, под ректальным контролем катетер продвигают через цервикальный канал. После прохождения цервикального канала катетер вводят в рог матки, на стороне которого в яичнике имеется хорошо развитое, функционирующее желтое тело. Форма желтого тела должна быть округлой, с четко выраженной на верхушке ямкой в виде грибка. Катетер продвигают как можно ближе к верхушке рога матки, ректально контролируя положение округлой головной части инструмента. Убедившись в правильности расположения инструмента, специалист осторожно выдавливает содержимое пайетты в просвет рога матки. Извлекать катетер из полости матки реципиента необходимо осторожным движением.

Скорость пересадки эмбрионов определяет показатель стельности. Поэтому пересадку должны проводить быстро и осторожно. Оптимальное время пересадки 1-2 мин.

Эффективность пересадки эмбрионов повышается при использовании препаратов (миорелаксантов), уменьшающих сокращения эндометрия при манипуляции с маткой (табл. 7).

Таблица 7

Приживляемость эмбрионов в зависимости от используемого препарата

Показатели	Группы		
	I	II	III
	контроль	ханегиф	ханегиф + аминазин

Число эмбриопересадок, n	100	100	120
Число стельных реципиентов, n	47	55	77
Процент стельности	47,0	55,0	64,0

Результаты проведенных опытов показывают, что применение ханегифа при пересадке эмбрионов повышает их приживляемость до 55%, а комплексное использование ханегифа и аменазина до 64%.

На 60-90 день после пересадки зародышей животных исследуют на стельность методом ректальной пальпации.

2.9. Микрохирургическое деление эмбрионов

Необходимость быстрого увеличения количества высокоценных в племенном отношении животных дала толчок к поискам новых способов размножения, позволяющих получать относительно однородный в генетическом плане материал.

Используя метод микрохирургического деления эмбрионов, представляется возможность повышения эффективности трансплантации эмбрионов за счет увеличения эмбриоматериала, получения клонов генетически идентичных животных с заданными хозяйственно-полезными признаками и желаемого пола.

Для деления отбираются эмбрионы только хорошего или отличного качества на стадии поздней морулы или бластоцисты, как свежеполученные, так и замороженно-оттаянные.

Микроманипуляции на эмбрионах проводятся с помощью микроманипулятора ПМ-2 или манипулятора французской фирмы "JMV" марки REF-4080 в чашке Петри под инвертируемым микроскопом "Labovet" или стереомикроскопом "Nikon".

В качестве рабочего инструмента для деления используется стеклянная микропипетка-игла, изготавливаемая из стандартных капилляров с внутренним диаметром 0,8 мм и внешним 1,2 мм на пуллере отечественного производства по методу Никитина В.А. Оптимальными являются следующие размеры: длина плеча 2,5 мм, конусная часть - 10 мм.

Рабочей поверхностью служит чашка Петри с обрезанным краем. Для фиксации клетки на дно чашки наносятся металлической иглой штрихи в разных направлениях.

Перед началом работы приготавливаются рабочие среды. Среда на основе фосфатно-солевого раствора Дюльбекко с добавлением 20% эмбриональной сыворотки и антибиотиков (100 ед/мл ампициллина и 12 мкг/мл гентамицина) используется для деления зародышей. Культивирование половинок проводят в среде TC-199 с добавлением 20% эмбриональной сыворотки, антибиотиков (100 ед/мл ампициллина и 12 мкг/мл гентамицина), лактата кальция (0,6 мг/мл),

пирувата натрия (0,2 мг/мл) и глутамина (0,15 мг/мл).

Деление эмбрионов осуществляют следующим образом. После оценки пригодные для микрохирургии зародыши переносятся в среду Дюльбекко. Затем клетка в капельке среды помещается на подготовленную чашку Петри над штрихами. Над ней размещают нож таким образом, чтобы плечо ножа не касалось чашки. Угол наклона ножа составляет 5° -25° к рабочей поверхности. Эмбрионы рассекаются опусканием ножа в медиальную плоскость клетки, одновременно разделяя оболочку и внутреннюю клеточную массу. При делении бластоцист необходимо разделять как эмбриобласт, так и трофобласт строго по середине. При проведении микрохирургической операции соблюдаются следующие правила: 1 - микроигла на эмбрион опускается постепенно, с паузами (нажим, пауза, нажим, пауза и т.д.); 2 - после начала деления нельзя резко поднимать нож, т.к. клетка находится в напряженном состоянии и резкое поднятие ножа вызывает отрицательное давление, что приводит к гибели клетки. Эмбрионы делят двумя методами. В первом случае эмбрионы рассекаются полностью, полученные половинки в дополнительные зоны пеллюцида не пересаживаются. Во втором случае деление прозрачной оболочки проводится частично, а внутренняя клеточная масса делится полностью. Полученные полуэмбрионы остаются в собственной оболочке. Критерием успешного деления считают минимальное повреждение бластомеров и получение симметричных половинок.

Затем полуэмбрионы переносятся в среду для культивирования и помещаются в термостат при температуре +38° С во влажную атмосферу, содержащую 5% CO₂ на 0,5-24 часа. Если в результате культивирования эмбрионы округлились, приняв обычную форму, считается, что деление прошло успешно. Их заправляют в пайетты и пересаживают реципиентам.

В ходе научно-производственных опытов нами установлено, что эффективность микрохирургического деления эмбрионов зависит, прежде всего, от метода деления, а также от способа их трансплантации реципиентам.

Таблица 8

Влияние метода деления на приживляемость половинок эмбрионов

Показатели	Методы деления	
	Полное разделение эмбрионов без помещения в свободные зоны пеллюцида	Частичное разделение эмбрионов, половинки оставались в свободной оболочке
Разделено эмбрионов, n	27	28
Получено половинок, n	49	51
Процент от разделенных	90,7	91,1

Пересажено половинок, n	47	48
Использовано реципиентов, n	34	24
Стельных реципиентов, n	15	14
Процент от числа используемых реципиентов	44,1	58,3

Таблица 9

Приживляемость полуэмбрионов крупного рогатого скота в зависимости от метода их пересадки.

<i>Показатели</i>	<i>Способ пересадки</i>		
	<i>Ипсилатерально</i>		<i>Билатерально</i>
	<i>Два полуэмбриона в один рог матки</i>	<i>Один полуэмбрион в один рог матки</i>	<i>Два полуэмбриона в разные рога матки</i>
Количество интактных эмбрионов, n	28	12	15
Получено половинок, n	51	21	28
Процент от разделенных	91,1	87,5	93,3
Пересажено половинок, n	48	21	26
Использовано реципиентов, n	24	21	13
Стельных реципиентов, n	14	8	7
в т. ч двойнями	6	-	3
Процент от числа использованных	58,3	38,1	53,8
Учтено отелов, n	3	3	2
Получено телят, всего	5	3	2
в т.ч. двойни	4	-	
одинцы	1	3	2

При делении зародышей на две части и без переноса половинок в свободные зоны пеллюцида продолжили свое развитие 90,7% полуэмбрионов, а их приживляемость была на уровне 44,1% (табл. 8). В случае, если проводили частичное разделение эмбрионов, а половинки оставляли в свободной оболочке, то сохранность деми-эмбрионов составила 91,1%, а приживляемость повысилась до 58,3%.

Было установлено, что при ипсилатеральной пересадке одного полуэмбриона стельными стали 38,1% животных, в то время как при той же пересадке двух полуэмбрионов одному реципиенту этот показатель составил 58,3% (табл. 9).

Билатеральная пересадка двух полуэмбрионов обеспечила 53,8% стельности.

Таким образом, лучшие результаты были получены при пересадке одновременно двух половинок эмбрионов как ипсилатерально, так и билатерально. Относительно невысокий уровень приживляемости (38,1%) при пересадке одного полуэмбриона доказывает, что эффективность приживляемости половинок зависит и от сигнала “эмбрион-реципиент”, с усилением которого повышается и уровень приживляемости деми-эмбрионов.

2.10. Криоконсервирование эмбрионов

Использование технологии криоконсервирования зародышей позволяет сохранить ценный эмбриоматериал при отсутствии животных-реципиентов, а также проводить трансплантацию эмбрионов в строго определенные сроки с максимальной эффективностью.

Технология глубокого замораживания и оттаивания зародышей предусматривает следующие этапы: выбор криопротектора и приготовление криозащитных растворов; качественная оценка зародышей, насыщение их криопротектором; постепенное охлаждение эмбрионов с помощью программных замораживателей; перенос эмбрионов в жидкий азот и их хранение; оттаивание при определенной температуре; выведение криопротектора из эмбриона; морфологическая оценка зародышей на пригодность к трансплантации.

Для криоконсервирования используют свежеполученные эмбрионы только отличного и хорошего качества. Основным условием при этом является сокращение до минимума времени манипуляций с эмбрионами от момента извлечения до замораживания.

Операции по подготовке зародышей к криоконсервированию (оценка их жизнеспособности, насыщение эмбрионов криопротектором, заправка в пайетты) проводят в стерильном боксе. Посудой для проводки эмбрионов служат стерильные часовые стекла с лунками и чашки Петри.

Наиболее эффективно замораживание поздних морул и ранних бластоцист. В качестве криопротекторов используют 1,4 М (10%) раствор глицерина и 1,5 М этиленгликоль.

Основой для приготовления рабочих растворов криопротекторов является среда Дюльбекко, содержащая 100 ед/мл ампициллина и 12,0 мкг/мл гентамицина и 20% фетальной сыворотки теленка. Насыщение эмбрионов глицерином осуществляется поэтапно в возрастающих концентрациях растворов (0,35 М; 0,7 М; 1,05 М; 1,4 М). Проводка осуществляется

в стеклах с лунками с экспозицией по 5 минут в первых трех концентрациях глицерина и 10 минут в 1,4 М раствора.

Насыщение эмбрионов 1,5 М раствором этиленгликоля проводится одноступенчато с выдержкой 10 минут. После выдержки в последнем растворе криопротектора эмбрионы с помощью микроаспиратора помещают в пайетты (не более 2 зародышей). Нижний конец пайетты закрывают пластиковой пробкой, на которой указывают дату извлечения, номер донора и номер пайетты.

Для замораживания эмбрионов используют программные замораживатели: ЗЭМ-4 (Украина), Мينيкул AC-25 (Франция), ЗМБИ-К (Россия).

Пайетты с эмбриоматериалом переносят в камеру для замораживания и включают программу. Снижение температуры происходит автоматически до заданного программного уровня. Затем пайетты переносят в жидкий азот для хранения.

Хранение замороженных эмбрионов осуществляется непосредственно в жидком азоте, в сосуде Дьюара. Используются стандартные канистры для хранения гранул спермы. Для транспортировки эмбрионов в замороженном состоянии применяют сосуд Дьюара емкостью 5 л с аналогичными канистрами.

Оттаивание пайетт с замороженными эмбрионами можно проводить одним из двух способов. Первый – в водяной бане при +37°C в течение 10 секунд; второй – оттаивание вначале на воздухе при +20-22°C в течение 10 секунд, затем в водяной бане при +25°C также 10 секунд. Затем пайетту освобождают от маркерной пробки, конец с пыжом отрезают и содержимое помещают на часовое стекло. Под микроскопом проводят подсчет количества оттаянных эмбрионов и предварительную морфологическую оценку. После этого эмбрионы отмывают от криопротектора.

Удаление криопротектора глицерина осуществляется в обратной последовательности (1,05 М; 0,7М; 0,35М) с выдержкой по 5 минут в каждом из растворов. Эмбрионы после проводки помещают в 20% эмбриональную сыворотку и ставят в термостат при +37°C на кратковременное культивирование (до 1 часа).

Зародыши, замороженные в 1,5М растворе этиленгликоля, после оттаивания также помещают в 20% эмбриональную сыворотку и культивируют. Затем проводят заключительную морфологическую оценку под микроскопом. Жизнеспособные зародыши заправляют в пайетты и пересаживают реципиентам.

Проведенные нами исследования по использованию 1,4М раствора глицерина и 1,5М этиленгликоля показали высокие результаты сохранности и приживляемости замороженно-оттаянных зародышей (табл. 10).

Однако, одноступенчатый способ насыщения зародышей 1,5М раствором этиленгликоля позволяет сократить в 2–2,5 раза затраты рабочего времени при манипуляциях с эмбрионами по сравнению с четырехступенчатым насыщением зародышей

1,4М раствором глицерина.

Таблица 10

Приживляемость замороженно-оттаянных эмбрионов в зависимости от используемого криопротектора и способа насыщения

Показатели	Криопротекторы	
	1,4М р-р глицерина	1,5М р-р этиленгликоля
Заморожено эмбрионов, п	64	55
Оттаяно эмбрионов, п	53	49
Жизнеспособных эмбрионов, п	46	44
Процент сохранности	86,8	89,7
Пересажено эмбрионов, п	41	43
Стельных реципиентов, п/%	20/48,7	21/51,2
Затрачено времени при манипуляции с эмбрионами, мин.	25	10

Выявлена зависимость сохранности и приживляемости замороженно-оттаянных эмбрионов от способа оттаивания (табл. 11).

Таблица 11

Эффективность способов оттаивания эмбрионов крупного рогатого скота

Показатели	Способы оттаивания эмбрионов	
	Водяная баня +37°C	На воздухе +20-22°C, затем в водяной бане +25°C
Заморожено эмбрионов, п	58	68
Оттаяно эмбрионов, п	48	50
Жизнеспособных эмбрионов, п	40	46
Процент сохранности	83,3	92,0
Пересажено эмбрионов, п	40	45

Стельных реципиентов, п/%	17/42,5	24/53,3
---------------------------	---------	---------

Из анализа данных таблицы 9 видно, что лучшие результаты по сохранности (92,0%) и приживляемости (53,3%) деконсервированных эмбрионов были получены при оттаивании зародышей на воздухе при +20-22°C, а затем в водяной бане при +25°C.

В последнее время эффективным является использование 0,7М сахарозы для выведения криопротекторов из клеток зародышей. Это повышает их сохранность и приживляемость.

2.11. Получение телят-двоен у крупного рогатого скота

В естественных условиях рождение двоен у крупного рогатого скота имеет весьма ограниченные пределы (0,1-4,5%) и зависит от породы, возраста животных и других факторов.

Повышение числа двойневых отелов возможно путем селекции на многоплодие, гормонального воздействия на организм и трансплантации эмбрионов. Осуществление на практике селекционных программ – дело сложное и требует времени в основном из-за низкого коэффициента наследуемости двойневости (0,012-0,025). Основной проблемой при гормональной стимуляции многоплодия является индивидуальная изменчивость и непредсказуемость овуляторной реакции яичников. Наряду с двойневой стельностью, отмечается трех-, четырех – и более плодные стельности, которые часто оканчиваются абортами.

Таблица 12

Эффективность получения двоен у крупного рогатого скота разными способами

Показатели	Способ получения двоен		
	Эмбриотрансплантация		Гормональная стимуляция
	Контрлатеральная пересадка одного интактного эмбриона осемененным реципиентам	Ипсилатеральная пересадка деми-эмбрионов не осемененным реципиентам	
Количество коров, п	38	25	50
Стельных коров, п-%	24-63,1	14-56,0	38-76,0
в том числе многоплодием, п-%	16-66,6	7-50,0	21-55,2

Число аборт, n-%	1-4,1	1-7,1	10-26,3
в том числе двумя и более плодами, n	1	1	10
Число отелов, n	23	13	28
Из них: двойней, n-%	15-62,5	6-42,8	10-26,3
тройней, n-%	-	-	1-2,6
Получено телят, n	38	19	40
Выход телят в расчете:			
на одну стельную корову, n	1,58	1,35	1,05
на одну отелившуюся корову, n	1,65	1,46	1,42
Сохранность телят в течение первого месяца жизни, n-%	36-94,7	17-89,4	35-87,5
Деловой выход молодняка в расчете на отелившуюся корову, n	1,56	1,30	1,25

Наиболее эффективным биотехнологическим методом получения телят-двоен у крупного рогатого скота является трансплантация эмбрионов. Этот метод, прежде всего, позволяет обеспечить билатеральное (т.е. в обоих рогах) размещение эмбрионов в матке реципиента, способствующее благоприятному течению стельности и отелов (*табл. 12*). Метод получения двоен включает этапы: отбор коров-доноров и реципиентов; гормональная обработка доноров; извлечение эмбрионов, поиск и оценка эмбрионов; подготовка реципиентов к пересадке; пересадка эмбрионов реципиентам.

Отличительными особенностями является то, что в качестве реципиентов необходимо использовать полновозрастных коров живой массой 550-600кг. При проявлении признаков половой охоты параллельно проводится искусственное осеменение и коров-доноров, и реципиентов. На 7-8 день после осеменения, в случае наличия в яичнике хорошо выраженного желтого тела, реципиентам пересаживают один эмбрион в контрлатеральный рог матки (т.е. в противоположный рог, смежному с яичником, имеющим желтое тело).

В целом, данный биотехнологический прием позволяет получить до 63,1% стельных коров, из которых 66,6% - стельных двойнями.

Результативность повышается, если осеменение коров-доноров проводить семенем быков не родственных быкам, семенем которых осеменяют реципиентов. В этом случае, трансплантация реципиентам гетерозиготных (неодинаковых по генетическим задаткам) эмбрионов относительно собственных обеспечивает стельность в 72,2% случаев, при этом

двойневые стельности составляют 70,8%.

Диагностирование стельности ректальным методом необходимо проводить спустя 2-3 месяца после осеменения и эмбриопересадок. При наличии у коров флюктуации околоплодной жидкости в обоих рогах матки и относительно равных их размерах велика вероятность стельности двумя плодами. У коров с двойневой стельностью, особенно в заключительный период, повышаются обменные процессы и усиливается перенос питательных и биологически активных веществ к развивающимся плодам. Поэтому таким животным необходимо обеспечить полноценное кормление в сухостойный период, который, независимо от продуктивности, должен составлять не менее 60 дней.

Следует учитывать тот факт, что отелы двойней в 2-3 раза чаще, чем одиноком, сопровождаются оперативным родовспоможением, главным образом, из-за одновременного вступления плодов в родовые пути коровы. Поэтому отёлы у коров должны проходить в родильном отделении под наблюдением ветспециалистов.

В связи с тем, что телята-двойни из-за более низкой живой массы при рождении (на 20-30% ниже живой массы одиночного теленка) характеризуются невысокой жизнеспособностью, то рекомендуется в зимне-стойловый период проводить внутримышечные инъекции эмульсии тетравит+АСДф-2 коровам, вынашивающим два плода, на 170, 200, 230, 260 дни стельности в дозе 15 мл+4 мл и, дополнительно, внутримышечные инъекции эмульсии данных препаратов их двойневному потомству на 15, 30, 45, 60 и 75 дни после рождения в дозе 2,5мл+0,5мл. Это позволяет на протяжении первых 90 дней выращивания телят-двоен довести их сохранность до 95%.

2.12. Эффективность использования метода трансплантации эмбрионов в молочном скотоводстве Республики Беларусь

На современном этапе одним из основных методов совершенствования молочного скота является искусственное осеменение. Однако оно не обеспечивает в достаточной мере ускоренного выведения животных с высокими показателями продуктивности. Имеющееся в республике поголовье быкопроизводящих коров не удовлетворяет потребность госплемпредприятий в быках-производителях.

В сложившейся ситуации метод трансплантации эмбрионов открывает огромные возможности в разведении и воспроизводстве крупного рогатого скота как с целью повышения эффективности племенной работы, так и увеличения производства говядины за счет получения двоен.

В настоящее время на базе интенсивного использования генетически ценных быков-производителей с применением искусственного осеменения коров темпы селекции в сравнении с обычными увеличиваются в 2-3 раза. В то же время генетический вклад в прогресс селекции матерей быков почти в 2 раза ниже вклада отцов быков. Это объясняется низкой интенсивностью селекции матерей быков и ненадежной оценкой их племенной ценности из-за получения небольшого числа

потомства. В странах с развитым молочным животноводством для повышения генетического прогресса проводится интенсивный отбор коров - потенциальных матерей быков. Таких коров используют в качестве доноров генетически ценных эмбрионов. Применение технологии трансплантации эмбрионов позволяет в короткие сроки получать высокоценные маточные семейства и более точно оценивать качество потомства.

Результаты применения трансплантации на практике в республике показывают, что этот метод позволяет получать при разовом использовании донора 2,5-3,0 теленка в год, при многократном (2-5 раз в год) – 6-20 и более телят. В тоже время, используя искусственное осеменение, от коров получают одного, в редких случаях два теленка в год.

Результаты исследований показали, что удой коров-трансплантантов был выше на 458,2 кг чем сверстниц и на 398,7 кг, чем матерей доноров (табл. 13).

Статистически достоверные различия ($P \leq 0,05$) по удою отмечены между трансплантантами и матерями-реципиентами.

Показатели жирномолочности по группам подопытных коров свидетельствуют, что первотелки, полученные методом эмбриотрансплантации, практически не отличались от своих сверстниц, а также от истинных и приемных матерей, полученных путем искусственного осеменения.

Таблица 13

Реализация биологических возможностей коров-доноров

Инд.№ донора	Хозяйство	Продуктивность донора	Кратность исп. донора	Получено эмбрионов		Получено телят всего	В том числе	
				Всего	Пригодных		бычки	телочки
1950	п-з “Кр. звезда”	7-8264-3,88	5	57	38	17	10	7
086	-//-	1-7027-3,84	2	20	15	6	1	5
4064	-//-	1-7686-3,88	1	12	8	5	-	5
9079	-//-	5-14118-4,31	4	32	14	5	2	3
9695	-//-	5-10149-4,20	3	22	18	10	6	4
361	п-з “Березки”	4-9555-4,16	7	31	27	13	9	4
202	п-з “Носовичи”	3-7560-4,10	2	10	8	6	4	2
4220	-//-	2-6100-3,95	2	13	11	7	4	3
1896	-//-	3-6448-3,70	3	20	11	10	6	4

164	п-з “Кореличи”	3-7505-3,90	4	28	24	22	10	12
1661	-//-	3-7644-3,74	4	27	22	9	2	7
1887	-//-	3-8095-3,92	3	23	19	12	6	6
1857	-//-	1-7831-3,91	4	31	19	7	6	1
461	-//-	3-9665-3,92	5	46	37	10	5	5
267	-//-	2-8309-3,82	2	23	19	8	5	3
1141	-//-	3-8671-3,87	3	24	18	9	4	5
1286	-//-	3-7928-3,86	2	20	17	10	7	3
2315	-//-	2-8105-3,80	1	16	12	8	3	5
0587	-//-	3-8636-3,80	3	28	11	6	2	4
786	-//-	1-7901-3,85	1	18	16	5	2	3
2035	-//-	2-8521-4,10	1	46	20	7	6	1
1317	-//-	2-7050-3,80	1	11	8	5	4	1

Таблица 14

Молочная продуктивность коров за первую лактацию

Группы	п	Удой, кг		Содержание жира, %	
		$M \pm m$	CV	$M \pm m$	CV
Коровы-трансплантаны	25	5755 $\pm$ 174,2*	15,1	3,75 $\pm$ 0,03	3,4
Сверстницы	25	5296 $\pm$ 196,5	18,1	3,75 $\pm$ 0,03	3,3
Матери-доноры	25	5356 $\pm$ 165,5	15,4	3,70 $\pm$ 0,03	3,9
Матери-реципиенты	25	4981 $\pm$ 189,2	19,0	3,76 $\pm$ 0,03	3,8

Анализ показателей воспроизводительной способности подопытных животных проводился по первым двум отелам. Результаты представлены в таблице 15.

Установлено, что коровы, полученные методом трансплантации, по воспроизводительной способности не уступают сверстницам, а также матерям-донорам и матерям-реципиентам. Так, возраст первого отела у трансплантантов наступил в возрасте 27,7 мес., у сверстниц – в 28,2 мес., что указывает на хорошую скороспелость коров, полученных методом

трансплантации. Индекс осеменения – низкий, как у трансплантантов, так и у коров, полученных традиционным способом. Индекс плодовитости относительно высокий и равен у трансплантантов – 48,3, у коров контрольных групп - соответственно 47,6, 48,2 и 46,0.

Таблица 15

Воспроизводительная способность коров, полученных методом трансплантации зигот и искусственного осеменения

Показатели	Группы			
	опыт	контроль		
	трансплантанты	сверстницы	мат-донор	мать-реципиент
Возраст первого отела, мес.	27,7± 1,3	28,2± 0,94	27,8± 0,96	29,7± 1,02
Продолжительность стельности, дней	277,7± 1,67	280,7± 1,42	274,8± 2,15	272,0± 3,84
Индекс осеменения	1,33± 0,11	1,33± 0,11	1,48± 0,11	1,33± 0,13
Сервис-период, дней	81,2± 8,91	80,0± 6,86	92,2± 9,94	87,5± 10,54
Межотельный период, дней	358,0± 9,7	361,8± 7,48	362,8± 9,76	364,0± 12,21
Индекс плодовитости	48,3± 1,2	47,6± 1,07	48,2± 1,14	46,0± 1,48
Коэффициент воспроизводительной способности	1,03± 0,03	1,02± 0,02	1,02± 0,03	1,02± 0,04

В настоящее время метод трансплантации вышел за рамки научных исследований и благодаря высокой эффективности нашел свое применение на практике. Работа по трансплантации эмбрионов институтом проводится в племязаводах “Кореличи” Гродненской, “Носовичи”, “Березки” Гомельской, “Красная звезда”, э/б “Заречье” Минской областей.

За 10 лет работы лабораторией трансплантации эмбрионов БелНИИЖ обработано 1020 доноров, проведено 751 вымывание, получено 3348 качественных эмбрионов, проведено 2414 эмбриопересадок, получено 1268 телят-трансплантантов, в том числе монозиготных двоен – 36, заморожено 835 эмбрионов, 270 продано в товарные хозяйства. На ГПП республики используется более 100 быков-трансплантантов.

Накоплен значительный материал по характеристике быков-трансплантантов, которые используются на госплемпредприятиях республики. По данным зоотехнического учета, изучены рост и развитие быков-трансплантантов, количественные и качественные показатели спермопродукции в сравнении со сверстниками, полученными традиционным

методом.

Анализ возрастной динамики живой массы показал, что быки-трансплантаты имели несущественные, статистически недостоверные различия в сравнении со сверстниками. Так, в 9-ти месячном возрасте быки обеих групп имели одинаковую живую массу (312 и 312 кг), в 12-ти месячном возрасте трансплантаты несколько превосходили аналогов, а в возрасте 1,5-2 года наблюдалась обратная тенденция. В 3 года разница по живой массе была незначительная в пользу быков-трансплантантов (816 кг против 793 кг).

Быки-трансплантаты продуцировали сперму, которая по количественным и качественным характеристикам не имела статистически достоверных различий со спермой быков-сверстников (табл. 16). Средний объем эякулятов у трансплантантов составил 4,0 мл при концентрации спермиев 1,0 млрд/мл. Полученные эякуляты характеризовались хорошей подвижностью спермиев.

Оплодотворяемость маток от первого осеменения спермой быков- трансплантантов составила в среднем 57,1% против 58,9% у аналогов.

Таблица 16

Показатели спермопродукции быков-производителей.

<i>Показатели</i>	<i>Группы быков</i>	
	<i>трансплантаты</i>	<i>Полученные методом искусственного осеменения</i>
Количество голов	14	7
Количество эякулятов	166,8± 4,8	165,7± 7,9
Получено спермы, мл	668,8± 3,4	748± 6,8
Объем эякулятов, мл	4,0± 0,2	4,4± 0,2
Концентрация, млрд/мл	1,02± 0,02	1,1± 0,05
Подвижность, баллов	8,8± 0,1	8,7± 0,2

Одним из путей повышения производства молока и говядины является метод получения двоен на основе трансплантации эмбрионов. При этом не требуется увеличения численности поголовья коров.

Изучена эффективность способа контрлатеральной пересадки одного эмбриона осемененным коровам-реципиентам с целью получения двоен (табл. 17).

Таблица 17

Эффективность получения двоен у коров

<i>Показатели</i>	<i>Группы животных</i>	
	<i>Осемененные коровы + пересадка одного эмбриона</i>	<i>Искусственно осемененные коровы</i>
Число коров-реципиентов, n	30	30
Число стельных реципиентов, n/%	20/66,6	16/53,3
Количество аборт, n/%	1/5,0	-
1	2	3
в том числе двоен, n/%	1/100	-
Число отелов, n/%	19/95,0	16/100
в том числе двойней, n/%	12/63,0	-
Количество мертворожденных телят, n/%	1/5,2	1/6,2
в том числе близнецов, n/%	1/100	-
Получено живых телят, n	30	15
в том числе от числа: стельностей, %	150	93,7
отелов, %	157,9	93,7

Результаты исследований показывают, что при подсадке одного эмбриона осемененным реципиентам выход молодняка за счет двоен увеличивается на 64,2% в расчете на один отел по сравнению с искусственным осеменением.

Важно было проследить какое влияние оказывают близнецовые отелы на молочную продуктивность коров (табл.18).

Таблица 18

Показатели молочной продуктивности реципиентов телившихся двойнями и одиночками

Отелы	Лактации									
	I		II		III		IV		в среднем	
	удой, кг	% жира	удой, кг	% жира	удой, кг	% жира	удой, кг	% жира	удой, кг	% жира
Двойней (n=24)	5763± 242,7	3,89±0,06	7839± 474,9	3,85±0,01	7795± 460,0	3,88±0,04	7777± 257,3	3,89± 0,02	7380± 253,6	3,88±0,02
Одинцом (n=24)	5290± 248,6	3,84±0,05	6748± 296,5	3,84±0,01	6448,5± 511,5	3,74±0,07	6515± 457,2	3,86± 0,02	6311± 216,7	3,82±0,02
Разница	<u>473,2</u>	<u>0,05</u>	<u>1091</u>	<u>0,01</u>	<u>1346,5</u>	<u>0,14</u>	<u>1262</u>	<u>0,03</u>	<u>1069</u>	<u>0,06</u>
кг/%	8,0	-	14,0	-	17,3	-	16,3	-	14,5	-

Продуктивность коров телившихся близнецами была значительно выше продуктивности сверстниц после одиночных отелов. Различия отмечены как по удою, так и по содержанию жира в молоке. По первой лактации они составили 473,2 кг молока и 0,05% жира в пользу первотелок с близнецами.

Тенденция увеличения молочной продуктивности более четко прослеживается у коров по второй – четвертой лактациям. По третьей лактации различия были максимальными и составили по удою 1346,5 кг (17,3%), по содержание жира 0,14%. В целом, прибавка молока к удою за 1-4 лактации у коров после отела двойнями составила 1069 кг или 14,5% ($P \leq 0,05$), жиру – 0,06%.

Таким образом, разработанная учеными БелНИИЖ совместно с практиками технология трансплантации эмбрионов крупного рогатого скота и апробированная на производстве позволила по основным параметрам (выход 11-12 овуляций и 5,5-6,0 качественных эмбрионов на донора, 55 телят на 100 эмбриопересадок) выйти на лучшие зарубежные аналоги. Если при закупке эмбрионов в США стоимость одного в среднем составляет от 300-350 до 1000 долларов, то себестоимость эмбриона, полученного по технологии БелНИИЖ, обходится в 10-15 раз дешевле и составляет 30-35 долларов США. Затраты на выращивание племенного быка сокращаются в 1,5 раза по сравнению с завозом их по импорту. Полное внедрение технологии в республике позволяет экономить в год 600-700 тысяч долларов США и получать 1000-1200 телят-трансплантантов.