

MAJALAH



**KUMPULAN ALIH BAHASA DI
BIDANG PETERNAKAN DAN
KESEHATAN HEWAN**

**DISUSUN OLEH :
CECEP SASTRAWILUDIN, S.Pt
PARAMEDIK VETERINER MAHIR**

EDISI 3

TAHUN 2019

MAJALAH

**KUMPULAN ALIH BAHASA DI
BIDANG PETERNAKAN DAN
KESEHATAN HEWAN**

EDISI 3

TAHUN 2019

**CECEP SASTRAWILUDIN, S.Pt
PARAMEDIK VETERINER MAHIR**

DAFTAR ISI

No.	Judul	Halaman
1	Produksi in vitro embrio sapi : pola ekspresi gencumulus / granulosa menunjukkan atresia awal yang bermanfaat untuk kompetensi oosit	1
2	Performa Reproduksi babi dipilih untuk efek genetik sosial yang berbeda untuk pertumbuhan	11
3	Pengaruh asam klorogenik pada pematangan dan pemupukan oosit babi dan perkembangan embrio mereka dengan kultur sel granulosa sapi pembanding	19
4	Kriopreservasi embrio yang diproduksi secara in vitro: tantangan untuk penerapan komersial	25
5	Industri embrio Brasil dalam konteks: Tantangan, pelajaran, dan harapan untuk masa depan	35

Produksi in vitro embrio sapi : pola ekspresi gencumulus / granulosa menunjukkan atresia awal yang bermanfaat untuk kompetensi oosit

genulus Gianluca Mazzoni^{1,4}, Eduardo Razza², Hanne S. Pedersen³, Jan Secher¹, Haja N. Kadarmideen⁴, Henrik Callesen³, Lotte Stroebech^{1,5}, Kristine Freude¹, Poul Hyttel^{1,6}

¹Departemen Kedokteran Hewan dan Hewan, Universitas Kopenhagen, DK1870 Frederiksberg C, Denmark. ²Departemen Farmakologi, Institut Bioscience, Universitas Negara Bagian São Paulo, Distrito de Rubião Junior s / n, 18618-689, Botucatu, SP, Brasil. ³D bidang Ilmu Hewan, Universitas Aarhus, DK8830 Tjele, Denmark. ⁴Departemen Informasi Bio dan Kesehatan, Universitas Teknik Denmark, Kgs. Lyngby, Denmark. ⁵EmbryoTrans Biotech ApS, Koege, Denmark.

Abstrak

Produksi in vitro (IVP) embrio bovine telah menjadi teknologi yang tersebar luas yang diimplementasikan dalam pembibitan dan produksi ternak. Di sini, kami meninjau data baru pada ekspresi gen sel kumulus / granulosa, sebagaimana ditentukan oleh RNAseq pada bahan seluler dari cairan folik dikumpulkan pada tingkat hewan tunggal, dan menghubungkan temuan ini dengan data sebelumnya pada kompetensi perkembangan oosit dan ultrastruktur. Pola ekspresi gen sel cumulus / granulosa menunjukkan bahwa atresia folikular dini berhubungan dengan peningkatan hasil blastokista dan hipotesis ini didukung oleh data sebelumnya pada kompetensi oosit dan ultrastruktur.

Kata kunci: IVP, biomarker, transkriptomik, sel granulosa, atresia, sapi, kompetensi oosit.

Pendahuluan

Di Dunia Barat, ada peningkatan tuntutan pemerintah dan publik untuk produk susu ramah lingkungan yang diturunkan dalam kondisi mengamankan kesehatan dan kesejahteraan hewan. Tuntutan ini tercermin dalam program inovasi dan undang-undang yang diusulkan menentukan metode produksi, tetapi juga dalam tuntutan yang meningkat dari misalnya konsumen Denmark untuk produk organik yang menghasilkan harga 60% lebih tinggi untuk susu organik primer.

Pemuliaan dapat secara signifikan meningkatkan efisiensi dan ketahanan konversi pakan dan menurunkan emisi gas metana pada sapi (Colditz dan Hine, 2016; Negussie et al., 2017). Sejak awal tahun 2000, teknologi baru telah memungkinkan untuk mempercepat tingkat keuntungan genetik pada sapi domestik dengan seleksi genom sapi (Blasco dan Toro, 2014; Daetwyler et al., 2014). Hubungan antara sifat fenotipik dan penanda genom semakin andal dan termasuk meningkatkan fokus pada ketahanan dan efisiensi pakan. Denmark adalah salah satu negara terkemuka yang berkaitan dengan korelasi fenotip untuk produksi dan kesehatan untuk penanda genomik menurut total pahala Nordik (NTM) dalam bentuk polimorfisme nukleotida tunggal (SNPs) menggunakan Illumina BeadChip. Demikian juga, Denmark dan negara-negara lain sangat menekankan dalam pendaftaran emisi metana di dalam susu

USG-dipandu ovum pick-up (OPU) dan produksi in vitro (IVP) embrio memungkinkan untuk peningkatan yang signifikan pemanfaatan kolam gen perempuan sebagai beberapa embrio dari jenis kelamin tertentu dapat dihasilkan dari perempuan elit. Jika teknologi ini digunakan pada sapi muda yang sangat muda dan dikombinasikan dengan seleksi genomik embrio, dilakukan pada biopsi sel kecil sebelum transfer ke penerima, keuntungan pemendekan signifikan dari interval generasi ditambahkan (Kasinathan et al., 2015). Aplikasi gabungan OPU, IVP dan seleksi genom telah sampai saat ini menimbulkan tantangan teknis sehubungan dengan penanganan embrio dan amplifikasi DNA. Namun, kemajuan besar telah dicapai oleh mis. konsorsium EmbryoGene di Kanada sehubungan dengan optimalisasi metodologi, dan kombinasi OPU, IVP dan seleksi genomik embrio diyakini memegang janji-janji besar dalam pembibitan sapi (Saadi et al., 2014). Saat ini, tidak ada penggunaan komersial OPU / IVP di Denmark, dan penerapan teknologi untuk tujuan ilmiah telah ditahan hingga tahun 2014. Pembatasan ini disebabkan oleh fakta bahwa IVP sapi, dari waktu ke waktu, terhambat oleh gangguan kualitas embrio menghasilkan sindrom keturunan besar (LOS; Behboodi et al., 1995; Kruip dan Den Daas, 1997; Van Wagendonk-de Leeuw et al., 2000). Selama beberapa tahun terakhir, peningkatan formulasi media untuk pematangan oosit dan kultur embrio telah menghasilkan peningkatan kualitas embrio, meskipun peningkatan kehilangan embrio dini masih dapat dilihat

selama trimester pertama kehamilan (Alberto et al., 2013). Program epigenetik yang tidak jelas, sehubungan dengan misalnya Metilasi DNA, merupakan faktor potensial yang mendasari kerugian ini (Hori et al., 2010; Chen et al., 2015). Namun demikian, IVP telah diterima secara luas untuk produksi komersial embrio bovine di Amerika Selatan dan Amerika Utara dan sebagian Eropa dengan Denmark kurang di belakang.

Kemajuan besar telah dilakukan sehubungan dengan pengembangan media untuk IVP sapi, yang untuk sebagian besar telah menghilangkan LOS. Namun, kurang perhatian telah diberikan kepada variabel hasil oosit yang kompeten antara sapi donor (Tamassia et al., 2003) serta fakta bahwa efisiensi basal IVP masih relatif rendah dengan hanya 35-45% dari kumulus-oocyte complexes (COCs) dari morfologi yang baik menghasilkan blastokista (Mayes dan Sirard, 2001; Sirard et al., 2006; Muñoz et al., 2014).

Transkriptomik dapat membantu mengidentifikasi biomarker untuk kompetensi oosit (Uyar et al., 2013). Pada sapi, banyak penelitian telah memanfaatkan kekuatan teknologi Next-Generation Sequencing (NGS) untuk mengidentifikasi biomarker folikel (Orozco-Lucero dan Sirard, 2014). Sel-sel cumulus dan granulosa secara erat digabungkan ke oosit melalui parakrin dan sistem komunikasi interseluler dan memainkan peran utama dalam pengembangan kompetensi oosit (Macaulay et al., 2015). Oleh karena itu, kompartemen seluler ini dapat mencerminkan kualitas oosit dan mewakili target yang dapat dinilai untuk analisis, karena mereka disedot bersama dengan COC.

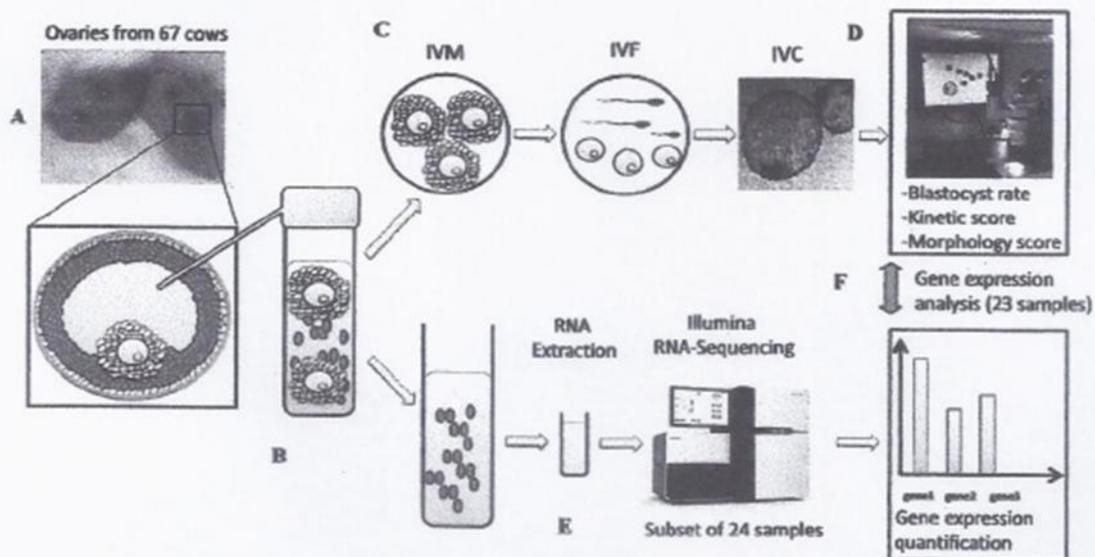
Penelitian sebelumnya telah membedah bagaimana profil sel granulosa bervariasi antara folikel dengan karakteristik yang berbeda, misalnya antara folikel pada tahap perkembangan yang berbeda (Girard et al., 2015), antara folikel dengan ukuran berbeda (Hatzirodos et al., 2014b) dan antara yang sehat dan folikel atretik (Hatzirodos et al., 2014a). Namun, tidak satu pun dari studi ini dilakukan pada tingkat binatang tunggal untuk memberikan informasi tentang kualitas hewan tertentu sebagai donor oosit potensial. Tujuan dari manuskrip ini adalah untuk meninjau upaya terakhir kami untuk menganalisis transkriptome kolektif

Anim. Reprod., V.14, n.3, p.482-489, Jul./Sept. 2017 483 kumulus / granulosa sel transkriptome dari sapi donor oosit individu untuk membedah pola ekspresi gen potensial terkait dengan kompetensi tinggi donor untuk IVP (Mazzoni et al., 2017). Data ini kemudian dikombinasikan dengan data sebelumnya dari kelompok kami pada ultrastruktur oosit selama dominasi folikel dan atresia untuk mengusulkan pemahaman mekanistik kompetensi IVP oosit (untuk ditinjau, lihat (Hyttel et al., 1997).

Ekspresi gen kandidat yang terkait dengan IVP hasil pada tingkat sapi tunggal

Untuk menemukan hubungan antara kolektif transkriptom sel kumulus / granulosa dan IVP dalam sapi donor individu, COC dan cairan folik dikumpulkan dari 67 sapi perorangan dan diproses untuk IVP termasuk pematangan, fertilisasi dan kultur in vitro (Mazzoni et al., 2017; Gambar. 1). Pada hari ke delapan setelah pembuahan, embrio dari semua hewan diberi skor berkaitan dengan tiga parameter: tingkat blastokista dihitung untuk setiap hewan sebagai jumlah blastokista atas jumlah total inseminasi COCs, skor kinetik diperoleh dengan klasifikasi visual masing-masing blastokista sebagai non-diperluas, diperluas atau menetas / menetas, dan am skor morfologi diperoleh dengan klasifikasi visual masing-masing blastokista sebagai miskin, baik atau sangat baik.

Gambar 1. Set-up eksperimental yang digunakan dalam Mazzoni et al. (2017). A) Ovarium dari 67 sapi Denmark dikumpulkan setelah disembelih dan setiap pasang ovarium disimpan terpisah. B) COC dari setiap hewan disedot dengan pompa vakum dan dipisahkan. C) COC diproses untuk produksi in vitro (IVP) termasuk in vitro maturation (IVM), inseminasi (IVF) dan kultur (IVC) sampai tahap blastokista (BL) (hari ke 8). D) parameter IVP untuk setiap hewan (laju BL, kinetika dan morfologi) dievaluasi pada hari ke 8. E) RNA diekstraksi dari sel folikuler yang terkandung dalam cairan aspirasi. Subset dari 24 sampel dipilih dan diurutkan; F) analisis sekuensing RNA dilakukan untuk mengidentifikasi gen yang terkait dengan penampilan IVP.



Pelet sel sentrifugasi (sel kumulus / granulosa) dari cairan folikel diproses untuk sekuensing RNA dan analisis bioinformatik (Mazzoni et al., 2017). Untuk analisis RNA, hanya sapi Holstein pertama atau beberapa laktasi yang digunakan dan 24 sampel dengan kualitas RNA yang lebih tinggi (nomor integritas RNA) adalah terpilih. Satu sampel dikeluarkan selama prosedur kontrol kualitas. Akibatnya, hubungan terakhir antara pola ekspresi gen dan hasil IVP dilakukan pada kelompok yang dipilih dari 23 sapi.

Seperti yang direferensikan di atas transcriptome kumulus / granulosa dikaitkan dengan status folikel. COCs diaspirasi untuk IVP berasal dari folikel latar belakang yang sangat heterogen dan akan mencakup folikel dominan dan subordinat pada lereng naik dan turun dari gelombang folikel (Forde et al., 2011). Menariknya, kami menemukan bahwa dua gen yang paling penting yang terkait dengan perkembangan folikel, yaitu gen reseptor FSH dan gen aromatase P450, diekspresikan secara terus menerus di semua hewan. Fakta ini menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan sistematis dalam status folikel antara hewan. Oleh karena itu, kami mempertimbangkan gen yang dalam keadaan ini berkorelasi dengan hasil IVP sebagai gen kandidat yang baik untuk memahami latar belakang molekuler untuk kompetensi oosit dan berpotensi memprediksi hasil IVP individu sapi dengan identifikasi biomarker yang dapat dinilai. Tiga parameter IVP diberi skor secara independen satu sama lain. Oleh karena itu, hipotesis kami adalah gen yang secara signifikan berkorelasi dengan ketiga parameter adalah yang paling signifikan berkenaan dengan kompetensi oosit dan penemuan biomarker potensial.

Ekspresi tujuh gen dicatat secara signifikan terkait dengan ketiga parameter blastokista: Ekspresi STC1 dan Mx1 berkorelasi positif, sedangkan ekspresi BEX2, RGN, HEY2, TXNDC11 dan TNFAIP6 berkorelasi negatif dengan hasil IVP yang baik. Sebagian besar gen ini sebelumnya telah ditemukan terlibat dalam pengendalian perkembangan folikel dan potensi perkembangan oosit.

STC1 sangat diekspresikan baik secara *in vivo* dan *in vitro* matur oocytes (Mamo et al., 2011). Protein STC1 disekresi dan diberikan kontrol parakrin sel pengembangan sel granulosa, dan diharapkan untuk memainkan peran penting dalam loop umpan balik antara cumulus / granulosa dan oosit (Luo et al., 2004). Fungsi pro-apoptosis STC1 sebelumnya telah dilaporkan (Law et al., 2008; Guo et al., 2013). Oleh karena itu, peningkatan ekspresi STC1 pada sapi dengan hasil IVP yang baik dapat dikaitkan dengan adanya atresia dini. Mx1 terlibat dalam pensinyalan interferon bersama dengan IRF dan IFNAR, yang keduanya diidentifikasi berkorelasi hanya dengan laju blastokista, menunjukkan bahwa secara khusus Mx1, tetapi juga dua gen lainnya, memiliki arti penting untuk kompetensi oosit sesuai dengan pengamatan pada spesies lain. termasuk manusia (Lédée et al., 2008). Selain itu, Mx1 telah dilaporkan sebagai penyebab kematian sel dan apoptosis (Mibayashi et al., 2002). Oleh karena itu, peningkatan regulasi Mx1 mungkin akibatnya dikaitkan dengan atresia dini dan, karenanya, meningkatkan hasil IVP (Gambar 2A).

BEX2 sebelumnya telah dilaporkan diregulasi dalam folikel besar dibandingkan dengan rekan-rekan yang lebih kecil (Hatzirodos et al., 2014b). BEX2 bertindak sebagai penghambat apoptosis di mitokondria dan mungkin, dengan demikian, mencegah atresia folikel. Oleh karena itu, downregulation dari BEX2 dapat dikaitkan dengan peningkatan apoptosis dan atresia dini dan, karenanya, meningkatkan hasil IVP (Gambar 2A). RGN sebelumnya telah ditemukan sebagai sangat diekspresikan selama dominasi folikel dan, menariknya, sebagai tindakan untuk meningkatkan kelangsungan hidup sel granulosa (Li et al., 2016). Sekali lagi, downregulation RGN dapat dikaitkan dengan atresia dini dan, karenanya, meningkatkan hasil IVP (Gambar 2A). HEY2 mengkode represor transkripsional, yang merupakan target downstream dari pensinyalan sel Notch. Menariknya, ekspresi NOTCH2 secara signifikan berkorelasi dengan laju blastokista rendah meskipun tidak ada korelasi signifikan dengan kinetika dan morfologi tercatat. Ini mungkin berspekulasi bahwa downregulation dari HEY2 dan NOTCH2, dan notch signaling seperti itu, dapat menginduksi apoptosis seperti yang telah ditunjukkan pada tikus (Zhang et al., 2011). Sekali lagi, downregulation HEY2 mungkin akibatnya dikaitkan dengan atresia dini dan, karenanya, meningkatkan hasil IVP (Gambar 2A).

TXNDC11 mengkodekan protein dengan domain thioredoxin yang mungkin bertindak sebagai regulator redoks. Ekspresi TXNDC11 tidak pernah dikaitkan dengan kompetensi oosit dalam sel granulosa, meskipun protein thioredoxin lainnya telah dikaitkan dengan kontrol atresia folikel ovarium melalui tindakan pemulungan pada spesies oksigen reaktif (ROS; Townson and Combelles, 2012). ROS merupakan salah satu kontributor utama untuk kerusakan oksidatif (Cadenas dan Packer, 1999; Patel et al., 1999; Turrens, 2003; Townson and Combelles, 2012) dan kematian sel (Ott et al., 2007). Kami berspekulasi bahwa ekspresi yang lebih rendah dari TXNDC11 dapat menyebabkan peningkatan konsentrasi ROS dan akibatnya mempromosikan atresia. Sekali lagi, downregulation dari TXNDC11 mungkin terkait dengan atresia dini dan, karenanya, meningkatkan hasil IVP (Gambar 2A).

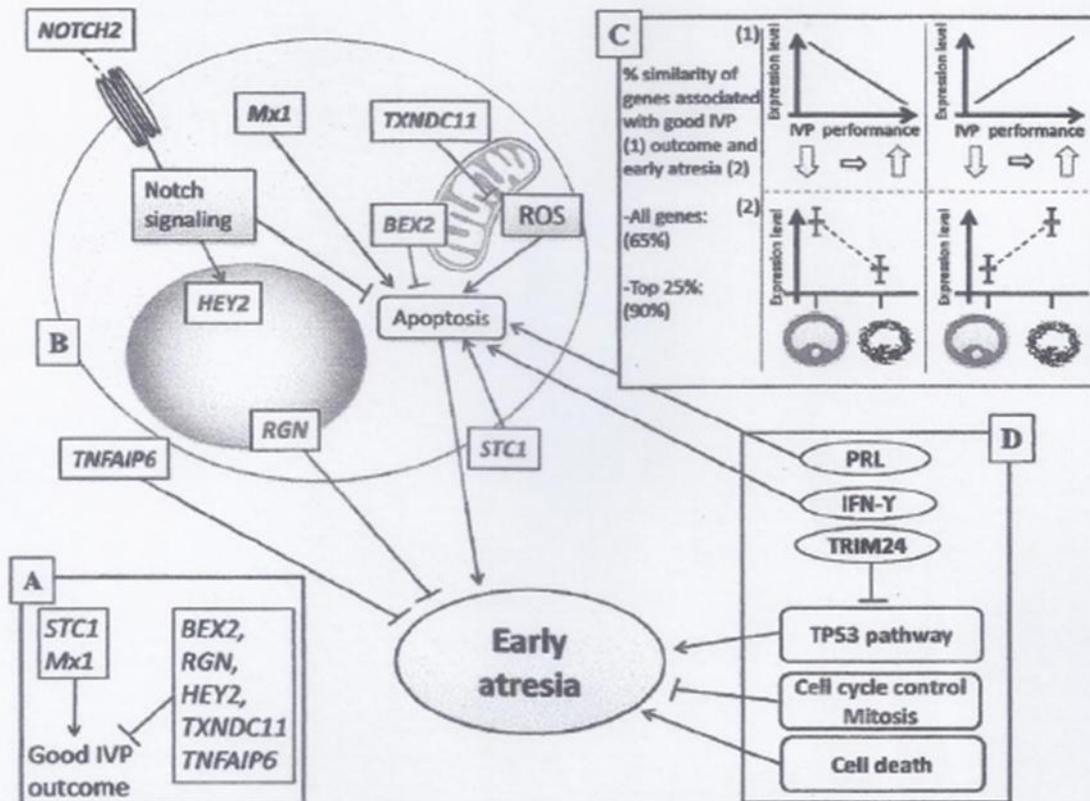
Ekspresi TNFAIP6 dalam sel granulosa telah berkorelasi dengan penurunan kompetensi oosit oosit setelah stimulasi ovarium (Gilbert et al., 2012). Protein TNFAIP6 merupakan komponen penting dari matriks ekstraseluler (ECM) berkat domain LINK yang mengikat hyaluronat. ECM mempromosikan kelangsungan hidup sel dan proliferasi sel granulosa selama perkembangan folikel pada sapi (Woodruff dan Shea, 2007; Salilew-Wondim et al., 2014; Ploutarchou et al., 2015). Sekali lagi, downregulation TNFAIP6 dapat dikaitkan dengan atresia dini dan, karenanya, meningkatkan hasil IVP (Gambar 2A).

Pertimbangan penting selama pemilihan gen kandidat yang mengkode potensi biomarker untuk kompetensi sapi tertentu untuk IVP adalah lokalisasi subselular dari produk protein mereka. Gen-gen yang produk-produk proteinnya disekresikan ke dalam ruang ekstraseluler (termasuk cairan folikel dan akhirnya plasma darah) dapat berpotensi diukur dalam cairan-cairan ini dan digunakan sebagai penanda biologis dari sifat-sifat IVP. Di antara gen kandidat yang dijelaskan di atas, hanya STC1 yang mengkodekan protein, yang disekresikan.

Pola ekspresi gen dalam kaitannya dengan ukuran folikel dan atresia

Analisis fungsional dari tujuh kandidat gen menunjukkan keterlibatan potensial mereka dalam atresia folikel. Sebelumnya, ekspresi gen pada sapi telah dilaporkan pada folikel antral atretik yang sehat vs awal (Hatzirodos et al., 2014a) dan dalam folikel kecil vs. sedang dan besar (Hatzirodos et al., 2014b). Sebuah analisis komparatif mengungkapkan bahwa 65% gen yang diidentifikasi secara diferensial diekspresikan pada folikel atretik awal vs folikel yang sehat (Hatzirodos et al., 2014a) menunjukkan kecenderungan yang sama (sedang naik atau turun regulasi) dalam penelitian kami dan persentase ini meningkat menjadi 90%. % mempertimbangkan 25% teratas dari gen berkorelasi positif dengan hasil IVP yang baik dalam penelitian kami (Gambar 2B). Sebaliknya, 84% gen yang diidentifikasi secara berbeda diekspresikan dalam folikel menengah dan besar vs folikel kecil (Hatzirodos et al., 2014b) menunjukkan kecenderungan yang berlawanan dalam penelitian kami dan persentase ini meningkat menjadi 92% ketika mempertimbangkan gen 25% teratas yang berkorelasi dengan blastosist. menilai dalam penelitian kami. Secara bersama-sama, pola ekspresi gen dalam penelitian kami dikombinasikan dengan data pada atresia dan ukuran folikel menunjukkan bahwa hasil IVP yang baik berkorelasi positif dengan atresia dini dan berkorelasi negatif dengan ukuran folikel. Oleh karena itu, sangat menarik, hubungan ini menunjukkan folikel atretik kecil awal sebagai menghasilkan oosit yang paling kompeten untuk IVP.

Gambar 2. Ringkasan bukti-bukti yang mengarah pada hipotesis bahwa atresia dini berkorelasi dengan hasil IVP yang baik. Figur meringkas semua bukti bioinformatika yang mengarah ke hipotesis atresia. A) Tingkat ekspresi 7 gen secara signifikan berkorelasi dengan semua parameter hasil IVP yang baik: Blastocyst rate, skor kinetik dan skor morfologi. B) Skema representasi sel granulosa dengan gen kandidat dan mekanisme yang mendukung korelasi positif antara atresia dini dan hasil IVP yang baik. C) Representasi perbandingan antara profil ekspresi dalam penelitian kami (1) dan profil ekspresi folikel atretik versus sehat dari Hatzirodos et al. (2014a; 2). D) Jalur yang diperkaya dan regulator hulu terkait dengan hasil IVP. Kode warna teks: Hijau = korelasi positif dengan hasil IVP yang baik; merah = korelasi negatif dengan hasil IVP yang baik. Kode bentuk: Rectangles = gen kandidat; oval = regulator hulu; persegi panjang bulat = proses dan jalur biologis, persegi panjang yang diisi abu-abu = molekul atau sinyal molekuler. Kode panah: Panah hijau = aktivasi; garis merah = penghambatan.



Pengayaan jalur dan analisis regulator hulu terkait dengan atresia folikel

Analisis pengayaan jalur fungsional dapat mengidentifikasi fungsi-fungsi biologis dan jalur yang terwakili dalam set gen yang terkait dengan sifat tertentu yang menarik. Analisis fungsional dengan Ingenuity® Pathway suite (IPA®) memprediksi keadaan aktivasi (diaktifkan atau dihambat) dari proses biologis dan regulator hulu utama untuk gen yang terkait dengan sifat tertentu yang menarik. Pengayaan fungsional dilakukan untuk mengekstrak wawasan biologis terkait dengan proses IVP dari profil ekspresi gen dan memberikan bukti-bukti baru yang mempertahankan hubungan antara folikel atretik kecil awal dan hasil IVP yang baik. Oleh karena itu, beberapa jalur atau proses biologis diidentifikasi sebagai signifikan untuk hasil IVP. Secara rinci, proses untuk pengendalian proliferasi sel dan perkembangan (mitosis, kontrol siklus sel) berkorelasi negatif dengan hasil IVP yang baik sementara proses kematian sel dan jalur TP53 berkorelasi positif dengan hasil IVP yang baik (Gambar 2C).

Analisis regulator hulu dilakukan untuk mengidentifikasi protein kunci yang bertanggung jawab untuk mengontrol ekspresi gen yang kami temukan terkait dengan hasil IVP yang baik. Oleh karena itu, bahkan jika ekspresi regulator hulu tidak diidentifikasi dalam dataset kami sebagai benar-benar berbeda menyatakan mereka secara tidak langsung mewakili calon protein potensial untuk hasil IVP. Regulator hulu penting dari gen yang terkait dengan hasil IVP yang baik adalah TRIM24, PRL dan IFN- γ (Gambar 2C).

TRIM24 diidentifikasi sebagai represor hulu TP53 yang mempromosikan degradasi protein ini. Oleh karena itu, TRIM24 dianggap mencegah apoptosis yang diinduksi TP53 dan, dengan demikian, atresia. Jalur TP53 secara khusus menarik karena diregulasi pada apoptosis (Fridman dan Lowe, 2003) dan telah diidentifikasi sebagai diaktifkan ketika folikel tumbuh bovine memasuki fase plateau dari gelombang folikel dan memulai atresia (Nivet et al., 2013). Oleh karena itu, peningkatan regulasi jalur TP53 mungkin akibatnya dikaitkan dengan atresia dini dan, karenanya, meningkatkan hasil IVP (Gambar 2C).

PRL atau prolaktin diprediksi sedang diaktivasi pada sapi dengan hasil IVP yang baik oleh analisis regulator hulu dengan IPA® Aktivasi jalur PRL sebelumnya telah dilaporkan berkorelasi positif dengan kompetensi oosit (Nivet et al., 2013) dan dengan terjadinya atresia (Lebedeva et al., 1998). Dalam tikus, administrasi PRL telah di satu sisi mengakibatkan peningkatan jumlah folikel atretik *in vivo* (Besnard et al., 2001) dan, di sisi lain, dalam penurunan kelimpahan sel granulosa pada tahap akhir sel kematian *in vitro* (Lebedeva et al., 1998; Heleil et al., 2010) dikombinasikan dengan peningkatan perkembangan embrio ke tahap morula dan blastocyst (Kuz'mina et al., 2001). Sekali lagi, peningkatan regulasi jalur PRL akibatnya dapat dikaitkan dengan atresia dini dan, karenanya, meningkatkan hasil IVP (Gambar 2C).

Ekspresi IFN- γ tidak diamati pada sampel sel granulosa kami. Namun, analisis regulator hulu dengan IPA® memprediksi IFN- γ harus diaktifkan. Dalam ovarium, IFN- γ hanya disintesis oleh sel imun (Best et al., 1995). Protein meningkatkan apoptosis dan telah ditemukan secara eksklusif pada folikel atretik pada manusia (Best et al., 1995; Best and Hill, 2000). Sekali lagi, peningkatan regulasi jalur IFN- γ mungkin akibatnya dikaitkan dengan atresia dini dan, karenanya, meningkatkan hasil IVP (Gambar 2C).

Menariknya, kami menemukan bahwa aktivasi sistem kekebalan berkorelasi negatif dengan hasil IVP yang baik. Kami berspekulasi bahwa sistem kekebalan tubuh terkait dengan atresia akhir sedangkan atresia awal belum mengaktifkan respons jenis ini. Ini sebagian dikonfirmasi oleh penelitian sebelumnya pada manusia, di mana sel-sel kekebalan tubuh dan, khususnya, makrofag yang berlimpah direkrut dalam folikel pada stadium lanjut atresia (Petrovská et al., 1996; Takaya et al., 1997; Gaytan et al., 1998). Sekali lagi, spekulasi ini mendukung gagasan bahwa atresia dini, tetapi bukan atresia yang terlambat, berkorelasi positif dengan hasil IVP yang baik.

Namun, makrofag juga ditemukan hadir dalam folikel yang sehat dan kelimpahannya meningkat selama pertumbuhan folikel (Wu et al., 2004). Telah disarankan bahwa makrofag mempromosikan proliferasi granulosa (Fukumatsu et al., 1992) atau atresia dengan mengatur keseimbangan antara proliferasi seluler dan apoptosis melalui sekresi faktor seperti TNF α (Kaipia et al., 1996; Wu et al., 2004) atau IFN- γ (Mazzoni et al., 2017) seperti yang dijelaskan sebelumnya. Mekanisme-mekanisme ini masih diperdebatkan dan harus ditangani dalam penelitian selanjutnya.

Ultrastruktur Oosit dan atresia awal

Teori bahwa atresia awal dikaitkan dengan hasil IVP yang baik telah dibahas sebelumnya (Moor dan Trounson, 1977; Wurth dan Kruip, 1992; Feng et al., 2007) dan secara langsung telah ditunjukkan bahwa hasil embrio adalah berkorelasi positif dengan atresia dini sedangkan atresia lambat memiliki dampak negatif (De Wit et al., 2000). Dengan demikian, potensi perkembangan oosit sebelumnya telah dilaporkan berkorelasi positif dengan apoptosis sel granulosa, yang secara luas digunakan untuk mengidentifikasi folikel atretik (Feng et al., 2007; Heleil et al., 2010).

Sepanjang garis ini, studi ultrastructural sebelumnya yang dilakukan di laboratorium kami juga menunjukkan penjelasan yang mendasari potensial dari korelasi positif antara hasil IVP yang baik dan atresia awal. Oleh karena itu, studi tentang ultrastruktur oosit dari folikel dominan yang mendekati ovulasi telah jelas menunjukkan bahwa ekspansi sel kumulus awal dan retraksi bertahap dari proses sel kumulus, melekat pada oosit melalui zona pellucida, dimulai bahkan sebelum puncak LH (Assey et al., 1994). Modulasi sel somatik ini terkait dengan perubahan dalam nukleus oosit, yaitu germinal vesicle, yang mengembangkan undulasi dari amplop nuklir, juga sebelum puncak LH. Setelah puncak LH proses-proses ini berujung pada dimulainya kembali meiosis dan kemajuan pematangan oosit sitoplasma selama 24 jam menyebabkan ovulasi. Kami juga menemukan bahwa urutan proses yang dijelaskan di atas dapat diamati pada oosit di folikel subordinasi folikel folikel, yaitu folikel yang mewakili atresia dini. Oleh karena itu, pada folikel atretik awal, oosit rupanya mengalami proses yang menyerupai yang terlihat pada folikel dominan mendekati ovulasi. Dilihat dalam cahaya ini, tidak mengherankan bahwa oosit yang dipanen dari folikel atretik awal mungkin lebih baik memenuhi syarat untuk memasuki pematangan akhir in vitro karena mereka mungkin "prima" untuk proses, sedangkan oosit dari folikel yang tumbuh sehat benar-benar terkunci dalam meiosis dan mungkin masalah pengalaman dalam kembalinya segera proses ini ketika ditempatkan di IVM. Menariknya, meluncur telah terbukti meningkatkan hasil embrio IVP (Nivet et al., 2013); efek yang mungkin juga didasarkan pada inisiasi atresia awal di kolam folikel.

Salah satu pendekatan untuk menangani masalah bahwa oosit mungkin tidak "prima" untuk IVM langsung pada aspirasi adalah untuk menginduksi penangkapan sementara pematangan oosit (Lonergan et al., 2003; Donnay et al., 2004; Vigneron et al., 2004). Bertahun-tahun kemudian, konsep ini diluncurkan lagi melalui media yang dirancang khusus, yang disebut sebagai pematangan oosit fisiologis simulasi (Albuz et al., 2010). Hasilnya bervariasi, dan versi kedua yang dimodifikasi sekarang sedang diuji (Gilchrist et al., 2015), yang mengilustrasikan bahwa solusi praktis untuk tantangan yang begitu rumit tidak selalu mudah. Sebuah diseksi dari fenomena ini saat ini sedang disimpulkan dalam cabang lain dari proyek GIFT Brasil-Denmark (Razza et al., 2016).

Kesimpulan:

Pola ekspresi gen sel granulus / granulosa menunjukkan bahwa atresia dini berhubungan dengan peningkatan hasil blastokista dan hipotesis ini didukung oleh data sebelumnya tentang kompetensi oosit dan ultrastruktur.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengakui pendanaan dari Komisi Program Kesehatan, Pangan dan Kesejahteraan dari Dewan Denmark untuk Penelitian Strategis untuk proyek GIFT (www.gift.ku.dk) dan dari hibah # 2012 / 50533-2, Yayasan Penelitian São Paulo (FAPESP). HNK mengakui Uni Eropa-FP7 Marie Curie Actions - Karir Integrasi Karier (CIG-293511) untuk pendanaan bagian dari waktu yang dihabiskan untuk artikel ini.

Referensi

Alberto ML, Meirelles FV, Perecin F, Ambrósio CE, Favaron PO, Francioli AL, Mess AM, Santos, JM, Rici RE, Bertolini M. 2013. Pengembangan embrio bovine berasal dari teknik reproduksi. *Reprod Fertil Dev*, 25: 907-917.
Albuz F, Sasseville M, Lane M, Armstrong, D, Thompson J, Gilchrist R. 2010. Simulasi pematangan oosit fisiologis (SPOM): sistem pematangan in vitro baru yang secara substansial meningkatkan hasil embrio dan hasil kehamilan. *Hum Reprod*, 25: 2999-3011.
Assey R, Hyttel P, Greve T, Purwantara B. 1994. Morfologi oosit pada folikel

dominan dan subordinat. *Mol Reprod Dev*, 37: 335-344. Behboodi E, Anderson G, BonDurant R, Cargill S, Kreuzer B, Medrano J, Murray J. 1995. Kelahiran anak sapi besar yang berkembang dari embrio sapi yang berasal dari in vitro. *Theriogenology*, 44: 227-232. Besnard N, Horne E, Whitehead S. 2001. Pengobatan prolaktin dan lipopolisakarida meningkatkan apoptosis dan atresia pada folikel ovarium tikus. *Acta Physiol*, 172: 17-25. Terbaik CL, Griffin PM, Hill JA. 1995. Gamma interferon menghambat produksi steroid sel granulosa manusia luteinisasi in vitro. *Am J Obstet Gynecol*, 172: 1505-1510. CL Terbaik, Hill JA. 2000. Sitokin dalam fungsi ovarium. Di: Hill JA (Ed.). *Sitokin dalam Reproduksi Manusia*. New York: Wiley-Liss. hlm 43-77. Blasco A, Toro MA. 2014. Sejarah kritis singkat penerapan genomik untuk pembiakan hewan. *Livest Sci*, 166: 4-9. Cadenas E, Packer L (Ed.). 1999. *Memahami Proses Penuaan: Peran Mitokondria: Radikal Bebas, dan Antioksidan*. Boca Raton, FL: Tekan CRC. 384 pp. Chen Z, Hagen DE, Elsik CG, Ji T, Morris CJ, Moon LE, Rivera RM. 2015. Karakterisasi kerugian global pencetakan pada sindrom pertumbuhan janin yang disebabkan oleh reproduksi dibantu. *Proc Nat Acad Sci*, 112: 4618-4623. Colditz IG, Hine BC. 2016. Ketahanan dalam hewan ternak: biologi, manajemen, pemuliaan dan implikasi untuk kesejahteraan hewan. *Anim Prod Sci*, 56: 1961-1983. Daetwyler HD, Capitan A, Pausch H, P Stothard, Van Binsbergen R, RF Brøndum, Liao X, Djari A, Rodriguez SC, Grohs C. 2014. Sekuensing seluruh genom dari 234 ekor lembu memfasilitasi pemetaan sifat monogenik dan kompleks pada sapi. *Nat Genet*, 46: 858-865. De Wit A, Wurth Y, Kruip T. 2000. Pengaruh fase ovarium dan kualitas folikel pada morfologi dan kapasitas perkembangan kompleks bovine cumulus-oocyte. *J Anim Sci*, 78: 1277-1283. Donnay I, Faerge I, Grøndahl C, Verhaeghe B, Sayoud H, Ponderato N, Galli C, Lazzari G. 2004. Pengaruh prematurasi, meiosis mengaktifkan sterol dan medium pematangan diperkaya pada pematangan nuklir dan kompetensi untuk perkembangan oosit betis. *Theriogenology*, 62: 1093-1107. Feng WG, Sui HS, Han ZB, Chang ZL, Zhou P, Liu DJ, Bao S, Tan JH. 2007. Pengaruh atresia folikel dan ukuran pada kompetensi perkembangan oosit sapi: studi menggunakan sistem kultur well-in-drop. *Theriogenology*, 67: 1339-1350. Forde N, Beltman M, Lonergan P, Diskin M, Roche J, Crowe M. 2011. Siklus yang luar biasa di sapi *Bos taurus*. *Anim Reprod Sci*, 124: 163-169. Fridman JS, Lowe SW. 2003. Pengendalian apoptosis oleh p53. *Onkogen*, 22: 9030-9040. Fukumatsu Y, Katabuchi H, Naito M, Takeya M, Takahashi K, Okamura H. 1992. Pengaruh makrofag pada proliferasi sel granulosa di ovarium pada tikus. *J Reprod Fertil*, 96: 241-249. Gaytan F, Morales C, Bellido C, Aguilar E, Sanchez- Criado J. 1998. Makrofag folikel ovarium: apakah atresia folikular pada tikus yang belum dewasa merupakan peristiwa makrofag-mediated? *Biol Reprod*, 58: 52-59. Gilbert I, Robert C, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA. 2012. Dampak lonjakan LH pada tingkat transkripsi sel granulosa sebagai penanda kompetensi perkembangan oosit pada sapi. *Reproduksi*, 143: 735-747. Gilchrist R, Zeng H, Wang X, Richani D, Smitz J, Thompson J. 2015. Reevaluasi dan evolusi sistem pematangan oosit fisiologis simulasi. *Theriogenology*, 84: 656-657. Girard A, Dufort I, Douville G, Sirard M-A. 2015. Ekspresi gen global dalam sel granulosa dari folikel yang tumbuh, dataran tinggi dan atretik yang dominan pada sapi. *Reprod Biol Endocrinol*, 13:17. doi: 10.1186 / s12958-015-00107. Guo F, Li Y, Wang J, Li Y, Li Y, Li G. 2013. Stanniocalcin1 (STC1) menghambat proliferasi sel dan invasi sel kanker serviks. *PloS One*, 8: e53989. Hatzirodos N, Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Harland ML, Morris SE, Rodgers RJ. 2014a. Transcriptome profiling sel granulosa dari folikel ovarium bovine selama atresia. *BMC Genomics*, 15, 40. doi: 10.1186 / 1471-2164-15-40. Hatzirodos N, Irving-Rodgers HF, Hummitzsch K, Harland ML, Morris SE, Rodgers RJ. 2014b. Transcriptome profiling sel granulosa folikel ovarium bovine selama pertumbuhan dari ukuran antral kecil ke besar. *BMC Genomics*, 15:24. doi: 10.1186 / 14712164-15-24. Heleil B, Kuzmina T, Alm H, Scotti O, Tuchscherer A, Torner H. 2010. Keterlibatan sel granulosa dalam realisasi efek prolaktin pada kompetensi perkembangan oosit sapi matang in vitro. *J Am Sci*, 6: 796-805 Hori N, Nagai M, Hirayama M, Hirai T, Matsuda K, Hayashi M, Tanaka T, Ozawa T, Horike S-I. 2010. Aberrant CpG methylation dari wilayah kontrol imprinting KvDMR1 terdeteksi pada anak-anak sapi yang diproduksi oleh teknologi reproduksi yang dibantu dan patogenesis sindrom keturunan besar. *Anim Reprod Sci*, 122: 303-312. Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. 1997. Pertumbuhan oosit, kapasitas dan pematangan akhir pada sapi. *Theriogenology*, 47: 23-32.

Kaipia A, Chun S-Y, Eisenhauer K, Hsueh A. 1996. Tumor necrosis factor-alpha dan messenger kedua, ceramide, menstimulasi apoptosis pada folikel ovarium yang dikultur. *Endokrinologi*, 137: 4864-4870. Kasinathan P, Wei H, Xiang T, Molina JA, Metzger J, Broek D, Kasinathan S, Faber DC, Allan MF. 2015. Percepatan perolehan genetik pada ternak dengan pengurangan interval generasi. *Sci Rep*, 5: 8674. doi: 10.1038 / srep08674. Kruip TA, Den Daas J. 1997. In vitro menghasilkan dan mengkloning embrio: efek pada kehamilan, kelahiran dan keturunan. *Theriogenology*, 47: 43-52. Kuz'mina T, Lebedeva IY, Torner H, Alm H. 2001. Pengaruh prolaktin dalam sistem budaya yang berbeda pada pematangan oosit sapi dan kapasitas mereka untuk perkembangan selanjutnya. *Russ J Dev Biol* ,, 32: 112-118. Hukum A, Lai K, Lui W, Wan H, Wong CK. 2008. Histone deacetylase inhibitor-induced seluler apoptosis melibatkan aktivasi stanniocalcin-1. *Exp Cell Res*, 314: 2975-2984. Lebedeva IY, Denisenko VY, Lebedev V, Kuzmina T. 1998. Prolaktin dalam cairan folikel dan kalsium intraseluler dalam sel folikuler terkait dengan tanda-tanda morfologis atresia folikel ovarium pada sapi: pekerjaan sedang berlangsung. *Theriogenology*, 49: 509-519. Lédée N, Lombroso R, Lombardelli L, Selva J, Dubanchet S, Chaouat G, Frankenne F, Foidart JM, Maggi E, Romagnani S. 2008. Sitokin dan kemokin dalam cairan folikel dan potensi embrio yang sesuai: peran faktor pembentuk granulosit. *Hum Reprod*, 23: 2001-2009. Li P, Meng J, Liu W, Smith GW, Yao J, Lyu L. 2016. Analisis transkriptome folikel ovarium bovin pada predeviation dan onset tahap deviasi dari gelombang folikel. *Int J Genomics*, 2016: 9pp. Lonergan P, Gutiérrez Adán A, Rizos D, Pintado B, De La Fuente J, Boland MP. 2003. Kelimpahan RNA messenger relatif dalam oosit sapi yang dikumpulkan in vitro atau in vivo sebelum dan 20 jam setelah lonjakan hormon luteinisasi preovulasi. *Mol Reprod Dev*, 66: 297-305. Luo C-W, Kawamura K, Klein C, Hsueh AJ. 2004. Regulasi paracrin diferensiasi sel granulosa ovarium oleh stanniocalcin (STC) 1: mediasi melalui reseptor STC1 spesifik. *Mol Endocrinol*, 18: 2085-2096. Macaulay AD, Gilbert I, Scantland S, Fournier E, Ashkar F, Bastien A, Saadi HAS, Gagné D, Sirard MA, Khandjian ÉW, Richard FJ, Hytte P, Robert C. 2015. Transcript sel Cumulus transit ke oosit sapi di persiapan untuk pematangan. *Biol Reprod*, 94:16. doi: 10.1095 / biolreprod.114.127571. Mamo S, Carter F, Lonergan P, Leal CL, Al Naib A, McGettigan P, Mehta JP, Evans AC, Fair T. 2011. Analisis berurutan dari profil ekspresi gen global pada immature dan in vitro matured bovine oocytes: penanda molekuler potensial dari pematangan oosit. *BMC Genomics*, 12: 151. doi: 10.1186 / 1471-2164-12-151. Mayes M, Sirard M. 2001. Pengaruh morfologi kompleks kumulosoosit dan inhibitor meiosis pada kinetika pematangan nuklir pada sapi. *Theriogenology*, 55: 911-922. Mazzoni G, Salleh SM, Freude K, Pedersen HS, Stroebech L, Callesen H, Hyttel P, Kadarmideen HN. 2017. Identifikasi biomarker potensial pada sapi donor untuk produksi embrio in vitro oleh transcriptomik sel granulosa. *PloS One*, 12: e0175464. Mibayashi M, Nakade K, Nagata K. 2002. Dipromosikan sel kematian sel mengekspresikan manusia MxA oleh infeksi virus influenza. *Microbiol Immunol*, 46: 29-36. Moor R, Trounson A. 1977. Faktor hormonal dan folikuler mempengaruhi pematangan oosit domba in vitro dan kapasitas perkembangan selanjutnya. *J Reprod Fertil*, 49: 101-109. Muñoz M, Uyar A, Correia E, Díez C, FernandezGonzalez A, Caamaño J, Martínez-Bello D, Trigal B, Humblot P, Ponsart C. 2014. Prediksi kelayakan kehamilan pada embrio yang diproduksi in vitro sapi dan plasma penerima dengan Fourier mengubah spektroskopi inframerah. *J Dairy Sci*, 97: 5497-5507. Negussie E, Lehtinen J, Mäntysaari P, Bayat A, Liinamo A-E, Mäntysaari E, Lidauer M. 2017. Pengukuran metana individu noninvasif pada sapi perah. *Hewan*, 11: 890-899. Nivet A-L, Vigneault C, Blondin P, Sirard M-A. 2013. Perubahan ekspresi gen sel granulosa terkait dengan peningkatan kompetensi oosit pada sapi. *Reproduksi*, 145: 555-565. Orozco-Lucero E, Sirard M. 2014. Penanda molekuler kesuburan pada oosit sapi dan embrio: kemajuan dan tantangan. *Anim Reprod*, 11: 183-194. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. 2007. Mitokondria, stres oksidatif dan kematian sel. *Apoptosis*, 12: 913-922. Patel RP, Cornwell T, Darley-Usmar VM. 1999. Biokimia oksida nitrat dan peroksinitrit: implikasi. Dalam: Cadenas E, Packer L (Ed.). *Memahami Proses Penuaan: Peran Mitokondria: Radikal Bebas, dan Antioksidan*. Boca Raton, FL: Tekan CRC. hlm. 39-56. Petrovská M, Dimitrov DG, Michael SD. 1996. Perubahan kuantitatif dalam distribusi makrofag di ovarium tikus normal selama siklus estrus diperiksa dengan sistem analisis citra. *Am J Reprod Immunol*, 36: 175-183. Ploutarchou P, Melo P, Hari AJ, Milner CM, Williams SA. 2015. Analisis molekuler matriks kumulus: wawasan dari tikus dengan oosit O-glycan-defisiensi. *Reproduksi*, 149: 533-543. Razza E, Pedersen H, Stroebech L, Machado M, Nogueira M, Kadarmideen H, Callesen H, Hyttel P. 2016. 192 Prematurasi kompleks bovine cumulus-oocyte dengan modulator adenosin monofosfat siklik mempengaruhi baik ultrastruktur oosit maupun blastokista. *Reprod Fertil Dev*, 28: 227. (abstrak). Saadi HAS, Vigneault C, Sargolzaei M, Gagné D, Fournier É, de Montera B, Chesnais J, Blondin P, Robert C. 2014. Dampak amplifikasi genom keseluruhan pada keandalan pra-transfer sapi embrio perkiraan nilai pemuliaan. *BMC Genomics*, 15: 889. Salilew-Wondim D, Ahmad I, Gebremedhn S, Sahadevan S, Hossain MM, Cincin F, Hoelker M, Tholen E, Neuhoff C, Looft C. 2014. Pola ekspresi microRNAs dalam sel granulosa dari folikel subordinat dan dominan selama awal fase luteal dari siklus bovine estrous. *PloS One*, 9: e106795. Sirard M-A, Richard F, Blondin P, Robert C. 2006. Kontribusi oosit terhadap kualitas embrio. *Theriogenology*, 65: 126-136. Sousa RV, CR Silva

Cardoso, Butzke G, Dode MAN, Rumpf R, Franco MM. 2017. Biopsi embrio bovine yang diproduksi in vivo dan in vitro tidak mempengaruhi tingkat kehamilan. *Theriogenology*, 90: 25-31

Takaya R, Fukaya T, Sasano H, Suzuki T, Tamura M, Yajima A. 1997. Makrofag di ovarium manusia siklus normal; lokalisasi dan karakterisasi imunohistokimia. *Hum Reprod*, 12: 1508-1512.

Tamassia M, Heyman Y, Lavergne Y, Richard C, Gelin V, Renard J, Chastant-Maillard S. 2003. Bukti efek sapi oosit oocyte atas produksi oosit dan perkembangan embrio in vitro. *Reproduksi*, 126: 629-637.

Townson DH, Combelles CM. 2012. Atresia folikular ovarium. Dalam: Darwis A. (Ed.). *Ginekologi Dasar - Beberapa Masalah Terkait*. Rijeka, Kroasia: In Tech. hlm 43-76. Tersedia di: www.intechopen.com//books/basicgynecology-beberapa-isu-terkait/ovarium-follicularatresia.

Turrens JF. 2003. Pembentukan mitokondria spesies oksigen reaktif. *J Physiol*, 552: 335-344.

Uyar A, Torrealday S, Seli E. 2013. Penanda cumulus dan granulosa sel oosit dan kualitas embrio. *Fertil Steril*, 99: 979-997.

Van Wagendonk-de Leeuw A, Mullaart E, De Roos A, Merton J, Den Daas J, Kemp B, De Ruigh L. 2000. Efek dari teknik reproduksi yang berbeda: AI, MOET atau IVP, pada kesehatan dan kesejahteraan anak sapi bovine. *Theriogenology*, 53: 575-597.

Vignerot C, Perreau C, Dupont J, Uzbekova S, Prigent C, Mermillod P. 2004. Beberapa jalur pensinyalan terlibat dalam kontrol pematangan oosit sapi. *Mol Reprod Dev*, 69: 466-474.

Woodruff TK, Shea LD. 2007. Peran matriks ekstraseluler dalam perkembangan folikel ovarium. *Reprod Sci*, 14: 6-10.

Wu R, Van der Hoek KH, Ryan NK, Norman RJ, Robker RL. 2004. Kontribusi makrofag untuk fungsi ovarium. *Update Hum Reprod*, 10: 119-133.

Wurth Y, Kruip TA. 1992. Produksi embrio sapi in vitro setelah seleksi folikel dan oosit. Dalam: *Prosiding Kongres Internasional ke-12 tentang Reproduksi Hewan*. Den Haag, Belanda: ICAR. hlm 387-389.

Zhang C-P, Yang J-L., Zhang J, Li L, Huang L, Ji SY, Hu Z-Y, Gao F, Liu Y-X. 2011. Notch signaling terlibat dalam pengembangan folikel ovarium dengan mengatur proliferasi sel granulosa. *Endokrinologi*, 152: 24372447

Performa Reproduksi babi dipilih untuk efek genetik sosial yang berbeda untuk pertumbuhan

Joon Ki Hong¹, Yong Min Kim¹, Kyu Ho Cho¹, Jun Chul Park¹, Deuk Hwan Lee^{2, 3}

¹Swine Science Division, Institut Ilmu Pengetahuan Hewan Nasional, Administrasi Pembangunan Pedesaan, Cheonan, Republik Korea. ²Departemen Sumber Daya Kehidupan Hewan, Universitas Hankyong, Anseong, Republik Korea.

Abstrak

Efek genetik sosial (SGE) adalah efek genetik dari individu yang mempengaruhi fenotipe mitra sosialnya. Kami menentukan konsekuensi reproduksi seleksi untuk SGE pada pertumbuhan babi. Untuk menyelidiki pengaruh efek genetik sosial terhadap pertumbuhan, gilt dibagi menjadi dua kelompok berdasarkan estimasi SGE: SGE sows positif (+ SGE) dan SGE sows negatif (-SGE). Pada saat seleksi, gilt adalah sezaman dan dikelola dengan cara yang sama. Kami mencatat kinerja reproduksi kedua kelompok berdasarkan paritas sampai pemusnahan. Kinerja reproduksi meliputi jumlah total anak babi yang lahir (TNB), jumlah anak babi yang dilahirkan hidup (NBA), berat badan lahir babi (BB) rata-rata, koefisien variasi untuk berat lahir (CVBW), usia pada first farrowing (AFF), penyapihan hingga interval estrus (WEI), dan panjang kehamilan (GL). TNB adalah 0,5 lebih tinggi untuk + SGE sows (13,8) daripada untuk -SGE sows ($P = 0,03$, SEM = 0,06), dan NBA menunjukkan kecenderungan yang lebih tinggi di + SGE sows ($P = 0,07$, SEM = 0,06). SGE positif untuk pertumbuhan diekspresikan pada AFF sebelumnya ($P = 0,04$, SEM = 1,10), dan WEI yang lebih pendek ($P < 0,01$, SEM = 0,08) dan GL ($P = 0,03$, SEM = 0,03). Secara kolektif, hasil penelitian ini menyoroti peluang untuk meningkatkan ukuran serasah, usia pada pelebaran pertama, panjang kehamilan, dan penyapihan ke interval estrus menggunakan SGE.

Kata-kata kunci: penampilan reproduksi, efek genetik sosial, tabur, pertumbuhan

Pendahuluan

Kelompok perumahan dari induk babi adalah umum di seluruh dunia; itu memungkinkan interaksi sosial, termasuk agresi selama pencampuran dan pada waktu makan (Barnett et al., 2001). Agresi dalam kelompok dapat menurunkan kesejahteraan dan kinerja karena cedera, gangguan kondisi tubuh, dan kehilangan embrio (Brown dan Seddon 2014). Baru-baru ini, metode seleksi yang mempertimbangkan interaksi sosial seperti agresi dalam kelompok dirancang. Metode seleksi ini menjelaskan pengaruh genetik seseorang terhadap nilai-nilai trait mitra sosialnya. Efek genetik individu pada fenotipe mitra sosialnya, seperti teman pena, dikenal sebagai efek genetik tidak langsung atau efek genetik sosial (SGE) (Moore et al., 1997; Bijma et al., 2007). Bergsma et al. (2008; 2013) melaporkan bahwa pertumbuhan babi dipengaruhi oleh interaksi sosial yang diwariskan di antara anggota kelompok. Dalam studi sebelumnya, babi terpilih untuk SGE positif pada pertumbuhan anggota kelompok mereka menunjukkan kurangnon-timbal balik dan agresi yang jauh lebih sedikit. (Camerlink et al., 2013; 2015). Selain itu, SGE positif untuk pertumbuhan terbukti memiliki efek positif pada kepribadian dan perilaku yang berhubungan dengan ketakutan pada anak babi yang menyusui (Reimert et al., 2013). Hasil ini menunjukkan peluang untuk mengurangi perilaku berbahaya yang disebabkan oleh kelompok perumahan babi. Bergsma et al. (2013) melaporkan bahwa dalam kasus korelasi genetik positif antara efek genetik sosial dan efisiensi laktasi, seleksi untuk sifat yang tumbuh di garis bendungan dapat dikombinasikan dengan seleksi untuk karakteristik kinerja laktasi.

Untuk implementasi praktis di garis bendungan, SGE harus diverifikasi dalam hal kinerja reproduksi. Selain itu, karakteristik perilaku dari SGE yang ditunjukkan dalam penelitian sebelumnya dapat meningkatkan kinerja reproduksi. Dengan demikian, Kami menentukan konsekuensi reproduksi seleksi untuk SGE pada pertumbuhan dalam tabur. Parameter kinerja reproduksi termasuk jumlah total anak babi yang lahir (TNB), jumlah anak babi yang dilahirkan hidup (NBA), berat badan lahir babi (BB) rata-rata, koefisien variasi untuk berat lahir (CVBW), usia pada first farrowing (AFF), penyapihan untuk interval estrus (WEI), dan panjang kehamilan (GL).

Bahan dan Metode

Perkiraan SGE pada tingkat pertumbuhan

Dataset yang dianalisis dalam penelitian ini terdiri dari data tingkat pertumbuhan yang diperoleh dari tes kinerja dari 14.624 babi Yorkshire lahir dari 2009 hingga 2015 di peternakan pembibitan inti di Korea (Tab. 1). Jumlah total hewan dalam silsilah adalah 16.383. Jumlah individu yang diketahui oleh kedua orang tua adalah 16.208. Di seluruh silsilah, sekitar 96% dari hewan yang dibesarkan. Koefisien inbreeding rata-rata adalah 0,07 dan kisaran koefisien inbreeding adalah 0,00002-0,303. Ukuran keluarga rata-rata yang diamati adalah 4,04, dengan kisaran 2-17. Koefisien inbreeding dan ukuran keluarga dari breed ini ditentukan menggunakan paket perangkat lunak CFC v1.0 (Sargolzaei et al., 2006). Evaluasi kinerja untuk perolehan harian rata-rata (ADG) dimulai ketika babi adalah $29 \pm 3,6$ kg ($74 \pm 3,8$ hari) dan berakhir ketika mereka mencapai $88 \pm 8,8$ kg ($151 \pm 4,4$ d) berat hidup (ADG $773 \pm 87,1$ g / d). Setiap pena berukuran $2,5 \times 3,6$ m (rata-rata $1,3$ m² / babi) dengan lantai beton padat dan menampung 4-10 individu dengan jenis kelamin yang sama; ada 1-7 saudara kandung dalam setiap kelompok. Babi diberi makan ad libitum dan air selalu diakses melalui peminum puting. Program makan diterapkan sesuai dengan standar pengujian babi Anim. Reprod., V.14, (Suppl.1), hal.1292-1297. 2017 1293 Asosiasi Peningkatan Animal Korea (<http://www.aiak.or.kr/eng/index.jsp>).

Tabel 1. Jumlah hewan per tahun dan sarana penelitian (standar deviasi) untuk ukuran kelompok, saudara kembar dalam kelompok, berat badan awal, berat akhir, usia pada akhir tes, dan perolehan harian rata-rata (ADG) dalam kelompok inti Nordik .

Test year	N	Group size	Full-sib within group	Start weight (kg)	End weight (kg)	Age at the end of test (d)	ADG (g/d)
2009	2,380	6.7 (1.8)	2.1 (0.7)	29 (3.3)	90 (8.6)	151 (4.4)	777 (87.1)
2010	2,512	6.8 (1.7)	2.1 (0.8)	29 (3.5)	90 (10.2)	150 (4.5)	771 (94.4)
2011	2,329	6.7 (1.8)	2.0 (0.7)	27 (3.5)	83 (7.9)	150 (3.4)	745 (88.1)
2012	2,242	6.6 (1.7)	2.1 (0.8)	29 (3.7)	88 (7.8)	151 (2.7)	780 (84.6)
2013	2,138	6.4 (1.7)	2.1 (0.7)	30 (3.4)	87 (6.5)	152 (3.1)	767 (72.4)
2014	2,432	6.8 (1.7)	2.3 (0.9)	30 (3.4)	90 (7.2)	152 (2.8)	797 (80.0)
2015	591	6.2 (1.7)	2.1 (0.9)	30 (3.5)	94 (11.7)	159 (10.1)	767 (101.4)
Total	14,624	6.6 (1.7)	2.1 (0.8)	29 (3.6)	88 (8.8)	151 (4.4)	773 (87.1)

Parameter genetik untuk ADG diperkirakan oleh restricted maximum likelihood (REML) dengan WOMBAT versi 1.0 (Meyer 2007), menggunakan model berikut yang menyumbang SGE: $y = Xb + ZDaD + ZSaS + Wl + Vg + e$, di mana y adalah vektor dari Observasi ADG; b adalah vektor efek tetap, yang termasuk kelompok (per minggu), jenis kelamin (pria dan wanita), usia di akhir tes, ukuran kelompok, dan jumlah saudara kandung dalam kelompok; Dv ektor efek genetik aditif langsung acak; S adalah vektor dari SGE acak; l adalah vektor untuk efek sampah non-genetik acak; g adalah vektor dari efek grup non-genetik acak (terhitung untuk kelompok di mana babi-babi tersebut ditulis selama periode akhir); e adalah vektor residual, dan X , matriks, ZD masing-masing, ZS W , dan V adalah kejadian yang sesuai.

ADG menunjukkan distribusi normal oleh uji normalitas Shapiro-Wilk (SAS Institute Inc., Cary, USA). Asumsi untuk distribusi probabilitas adalah varians dari efek yang sesuai. Baik efek genetik aditif langsung dan sosial dipasang, yang memiliki multivariat distribusi normal (MVN) berikut: $\sim MNV(0, C \quad A)$, di mana $C =$. TBV adalah efek yang dapat diwariskan dari seorang individu pada nilai-nilai sifat di, di mana $N()$ menunjukkan distribusi normal; A adalah matriks identitas dari dimensi yang sesuai; dan merupakan varian dari efek genetik langsung, adalah varians dari efek genetik sosial, adalah kovariansi antara efek genetik langsung dan sosial, A adalah matriks hubungan antara individu berdasarkan informasi silsilah, dan menunjukkan produk Kronecker.

Menurut Bijma dkk. (2007), untuk sifat-sifat yang dipengaruhi oleh efek sosial yang dapat diwariskan, varians TBV merepresentasikan total variasi yang diwariskan yang dapat dieksploitasi untuk seleksi. The TBV dari hewan-i didefinisikan sebagai berikut: *dan*, *dan*, *di mana*, populasi, yang merupakan jumlah dari efek genetik langsung dibagi.

(Penciptaan kelompok kontras genetik dan catatan reproduksi)

Untuk membuat dua kelompok kontras, gilt sama-sama pada saat (lahir tahun-bulan) seleksi ke mereka dengan efek genetik sosial yang diperkirakan positif (+ SGE) dan mereka dengan efek genetik sosial (SGE) yang diperkirakan negatif. Secara total, 43 kelompok perkawinan (lahir tahun-bulan) dipilih 2009-2012.

Gilts pada seleksi adalah sezaman dan dikelola dalam kondisi yang sama (individu perumahan). Pada usia pertama perkawinan gilt biasanya 230-250 d dan kawin dilakukan dua kali (24 jam dan 36 jam setelah pemasangan) oleh buatan inseminasi. Semua induk babi secara alamiah dan periode laktasi dari induk babi 24-28 d. Kami mencatat sifat-sifat reproduksi untuk induk dari dua kelompok per paritas sampai pemusnahan. Sifat-sifat reproduksi termasuk jumlah anak babi lahir (TNB), jumlah anak babi lahir hidup (NBA), berat badan lahir babi rata-rata (BB), koefisien variasi untuk berat lahir (CVBW), usia pada first farrowing (AFF), culling parity (CP), menyapih ke interval estrus (WEI), dan panjang kehamilan (GL) (Tab. 2). Kami hanya menggunakan data dari induk babi dengan) pada fenotipe dari $n - 1$ teman kelompoknya. Bijma dkk. (2007) juga menyatakan bahwa varian diwariskan total menentukan potensi populasi dalam menanggapi seleksi dan varian fenotipik.

Varians total diwariskan dapat dinyatakan sebagai: Variasi fenotipik untuk model seperti itu dapat dihitung sebagai berikut: σ^2 , di mana n menunjukkan ukuran rata-rata kelompok sosial ($n = 6.6$). Varians total diwariskan dapat dinyatakan relatif terhadap varians fenotipik sebagai berikut (Bergsma et al, 2008.): \Rightarrow Pada fenotipe sendiri dan SGE nya

lebih dari paritas untuk pertimbangan kinerja setelah periode terbaik (paritas 3 atau 4) reproduksi babi. Secara total, 124 ekor menghasilkan 753 catatan sifat reproduksi selama 1-9 paritas. Sapi + SGE memiliki total 388 catatan dan frekuensi dari farrowing per paritas adalah 42, 26, 8 dan 2 untuk paritas 6-9, berturut-turut. SALE-SOW menghasilkan 365 catatan sifat-sifat reproduksi dan frekuensi rekaman farrowing per paritas adalah 31, 18, 5, dan 1 untuk paritas 6-9, masing-masing. Untuk perbandingan paritas antara + SGE dan -SGE sows, semua catatan setelah paritas ketujuh dikonsolidasikan dengan Kesamaan ke 7. Mengikuti tes Shapiro-Wilk tentang normalitas, perbedaan signifikan antara keduanya $n + SGE$ dan $-GE SOW$ kelompok terdeteksi oleh t-test (AFF) dan analisis dua arah varians (ANOVA) (GLM prosedur) menggunakan SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, USA). Paritas dan kelompok SGE dimasukkan sebagai efek tetap dalam ANOVA 2 arah.

Tabel 2. Jumlah hewan per paritas dan sarana (standar deviasi) untuk sifat-sifat reproduksi dalam kawanan Yorkshire.

Parity	N	DP (d)	DL (d)	WEI (d)	TNB	NBA	BW (kg)	CVBW (%)
1	124	114 (1.4)	25 (3.0)	6.4 (3.2)	12.9 (2.9)	12.5 (2.8)	1.2 (0.2)	17 (6.1)
2	124	114 (1.5)	25 (3.2)	5.6 (2.3)	12.8 (3.1)	12.5 (2.9)	1.4 (0.2)	17 (6.5)
3	124	114 (1.5)	26 (2.9)	5.5 (2.5)	13.6 (3.4)	13.4 (3.4)	1.3 (0.2)	18 (6.8)
4	124	114 (1.4)	27 (2.7)	5.6 (2.3)	13.9 (3.8)	13.6 (3.7)	1.3 (0.2)	18 (6.8)
5	124	114 (1.5)	24 (7.1)	5.1 (0.5)	13.6 (3.9)	13.3 (3.8)	1.3 (0.2)	20 (15.0)
6	73	114 (1.6)	22 (9.6)	5.4 (1.2)	13.8 (3.4)	13.5 (3.3)	1.3 (0.2)	19 (7.1)
7	44	114 (1.6)	17 (10.7)	5.7 (1.9)	14.8 (3.4)	14.5 (3.4)	1.2 (0.2)	21 (6.3)
8	13	114 (1.1)	14 (12.0)	5.0 (0.0)	14.8 (2.2)	14.1 (1.7)	1.2 (0.2)	22 (6.6)
9	3	114 (0.8)	4 (0.8)	-	16.7 (1.9)	16.3 (1.7)	1.1 (0.0)	20 (5.2)

GL = panjang kehamilan; DL; durasi laktasi; WEI = menyapih ke interval estrus; TNB = jumlah total anak babi yang lahir; NBA = jumlah anak babi yang lahir hidup; BB = berat lahir anak babi rata-rata; CVBW = koefisien variasi untuk berat badan lahir.

Hasil

Perkiraan varians dan kovarians komponen untuk ADG disajikan pada Tabel 3. Varians genetik adalah = 2,513, = 55, = 9, dan = 3,400. Korelasi genetik (r) antara efek langsung dan sosial adalah 0,38 tetapi tidak menyimpang secara signifikan dari nol ($P = 0,21$). Jumlah seluruhnya heritability (h^2) untuk ADG adalah 0,49 yang 0,13 lebih besar dari heritability langsung (h^2_D). Hasil ini menunjukkan bahwa, selain dipengaruhi oleh lingkungan, efek sosial untuk ADG dipengaruhi oleh komponen genetik tambahan, sebuah temuan yang membenarkan pelaksanaan penciptaan kelompok-kelompok yang secara genetik berbeda. Ini menghasilkan 62 ekor babi dengan + SGE $0,8 \pm 0,47$ g / d dan 62 induk dengan SGE $-1,4 \pm 0,64$ g / d, menghasilkan kontras 2,2 g / d.

Tabel 3. Parameter genetik untuk perolehan harian rata-rata menggunakan model yang termasuk efek genetik sosial dalam kawanan inti Yorkshire (14.624 babi yang lahir dari 2009 hingga 2015).

$\sigma_{a_D}^2$	$\sigma_{a_D a_S}$	$\sigma_{a_S}^2$	σ_g^2	σ_l^2	σ_e^2	σ_{TBV}^2	σ_p^2	h^2_D	T^2	r	LogL
2,513	55	9	403	402	3,875	3,400	6,934	0.36	0.49	0.38	-69,551

^a $\sigma_{a_D}^2$ = direct genetic variance; $\sigma_{a_D a_S}$ = covariance between direct and social genetic effects; $\sigma_{a_S}^2$ = social genetic variance; σ_g^2 = group variance; σ_l^2 = litter variance; σ_e^2 = residual variance; σ_{TBV}^2 = the variance of total breeding value; σ_p^2 = phenotype variance; $h^2_D = \sigma_{a_D}^2 / \sigma_p^2$, direct heritability ; $T^2 = \sigma_{TBV}^2 / \sigma_p^2$, total heritability for model including social genetic effects; r = genetic correlation between direct and social effects; LogL = maximum likelihood estimate of the model.

Kinerja serasah ditunjukkan pada Tabel 4. TNB adalah 0,5 lebih tinggi di + SGE sows (13,8) daripada di - SGE Sows ($P < 0,05$). + Sapi SGE juga cenderung memiliki NBA yang lebih tinggi (13,4) dibandingkan dengan sapi SGE (13,0) ($P = 0,07$). Tidak ada perbedaan signifikan antara + SGE dan -SGE sows untuk BW ($P = 0,50$) dan CVBW ($P = 0,14$). Faktor paritas memberikan efek yang kuat, terlepas dari SGE, pada semua sifat kinerja serampangan ($P < 0,01$). Interaksi antara SGE dan paritas tidak signifikan untuk salah satu sifat kinerja serasah yang diukur ($P > 0,13$).

Tabel 4. Kinerja serasah untuk babi dengan positif (+) atau negatif (-) efek genetik sosial (SGE) dalam kawanan inti Yorkshire.

Item ^a	+SGE sows	-SGE sows	SEM ^b	SGE	P-value	
					Parity	SGE × Parity
Number of records	388	365				
TNB	13.8	13.3	0.06	0.03	<0.01	0.13
NBA	13.4	13.0	0.06	0.07	<0.01	0.13
BW	1.30	1.29	0.00	0.50	<0.01	0.41
CVBW	18.7	17.8	0.14	0.14	<0.01	0.77

TNB = jumlah anak babi lahir; NBA = jumlah anak babi yang dilahirkan hidup, BB = berat lahir anak babi rata-rata; CVBW = koefisien variasi untuk berat lahir. bSEM = Kesalahan standar dari nilai rata-rata

Nilai-nilai untuk AFF, WEI, dan DP + SGE dan -SGE sows disajikan pada Tabel 5. AFF dari + SGE sows adalah 347,2 d, yang 4,6 d lebih pendek dibandingkan dengan sapi SGE ($P = 0,04$, SEM = 1.1). WEI adalah 5,4 d untuk + SGE sows dan 5,9 d untuk WEI sows ($P < 0,01$,

SEM = 0,08). DP dari + SGE sows adalah 114,0, dibandingkan dengan 114,3 untuk -SGE sows ($P = 0,03$, SEM = 0.03). Interaksi antara SGE dan paritas tidak signifikan untuk salah satu sifat kinerja serasah yang diukur ($P > 0,07$).

Tabel 5. Mean dan SEM untuk sifat-sifat efisiensi reproduksi pada induk yang dikelola dengan positif (+) atau efek sosial negatif (-) sosial (SGE) dalam kawanan inti Yorkshire.

Item ^a	+SGE sows	-SGE sows	SEM ^b	P-value		
				SGE	Parity	SGE × Parity
Number of sows (records)	62 (388)	62 (365)				
AFF	347.2	351.8	1.10	0.04	-	-
WEI	5.4	5.9	0.08	<0.01	<0.01	0.07
GL	114.04	114.29	0.03	0.03	0.80	0.89

aAFF = umur pada farrowing pertama; WEI = menyapih ke interval estrus, GL = panjang kehamilan. bSEM = Kesalahan standar rata-rata

Diskusi Diskusi

: Kinerja Farrowing dan SGE

Dalam penelitian ini, + SGE sows memiliki TNB yang secara signifikan lebih tinggi dari -GE Sows ($P = 0,03$), SEM = 0,06). Selain itu, + SGE sows cenderung menunjukkan tren positif di NBA ($P = 0,07$, SEM = 0,06). Semakan dapat ditekan oleh berbagai faktor (kawin, gestasi dan farrowing, di antara yang lain ers). Stres ibu selama kehamilan dapat mempengaruhi perkembangan fisiologis keturunan dan mengganggu fungsi kekebalan humoral dan seluler pada anak babi yang menyusui (Tuchscherer et al., 2002). Babi SGE tinggi lebih mampu mengelola situasi stres dan kurang takut (Camerlink et al., 2013; Reimert et al., 2013; 2014). Oleh karena itu, + SGE sows mungkin kurang ditekan oleh faktor-faktor rutin, yang dapat menyebabkan janin yang sehat.

Meningkatkan potensi pertumbuhan individu dapat sedikit mengurangi ukuran total litter dan meningkatkan kematian perinatal (Johansson 1981; De Nise et al., 1983; Ducos dan Bidanel 1996). The SGE mewakili efek genetik individu pada pertumbuhan mitra sosialnya (Bijma et al., 2007) dan berbeda dari efek genetik pada pertumbuhannya sendiri. Seleksi untuk SGE telah ditunjukkan untuk mengubah perilaku sosial, yang dinyatakan dalam kejadian lebih rendah dari menggigit agresif, menggigit telinga (Camerlink et al., 2013; 2015; Reimert et al., 2013; 2014). Perilaku menggigit dianggap sebagai masalah kesejahteraan hewan yang penting. Camerlink dkk. (2015) melaporkan bahwa berbagai perilaku yang diubah melalui seleksi

SGE tampaknya mencerminkan keadaan internal daripada hanya interaksi sosial. + SGE bisa terjadi karena sikap apatis hewan, mengakibatkan berkurangnya efek negatif pada pertumbuhan orang lain (D'Eath et al., 2010; Rodenburg et al., 2010; Camerlink et al., 2015). Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk memperkirakan korelasi genetik antara SGE untuk pertumbuhan dan DGE (atau SGE) untuk sifat-sifat reproduksi. Kami tidak memperkirakan korelasi genetik ini karena penelitian ini adalah untuk menentukan konsekuensi reproduksi dari seleksi praktis untuk SGE pada pertumbuhan dalam tabur. Bunter dkk. (2015) menyelidiki konsekuensi dari SGE untuk sifat-sifat reproduksi di kandang babi kelompok dan melaporkan bahwa SGE untuk sifat-sifat reproduktif juga mencerminkan ekspresi fenotip yang tidak menonjol, seperti kompetisi babi. Ini bisa menunjukkan bahwa seleksi termasuk SGE penting tidak hanya untuk pertumbuhan kelompok dalam menyelesaikan babi, tetapi juga untuk reproduksi pada induk babi.

Reproduksi efisiensi dan SGE

Gilts biasanya mencapai farrowing pertama antara 300 dan 408 d usia, tergantung pada beberapa faktor seperti waktu kontak babi dan kondisi tubuh (Soede et al., 2011). Knauer dkk. (2011) melaporkan bahwa seleksi untuk estrus yang lebih lama dan refleks berdiri yang lebih kuat mengurangi usia pada first faring. Knauer dkk. (2011) juga melaporkan bahwa perilaku estrus superior betina yang lebih muda saat pubertas disebabkan oleh konsentrasi puncak estradiol yang lebih tinggi dibandingkan dengan betina yang lebih tua saat pubertas. Di antara wanita pertama-litte, Hong et al. Efek genetik sosial dan sifat-sifat reproduksi.

Sterning dkk. (1998) memperkirakan korelasi genetik negatif antara usia saat pubertas dan kemampuan untuk menunjukkan refleks berdiri dan ovulasi setelah penyapihan. AFF ditentukan menjadi cukup diwariskan (Serenius 2004; Serenius et al., 2008) dan korelasi antara tingkat pertumbuhan individu dan AFF telah terbukti bervariasi tergantung pada metode manajemen (positif: Knauer et al., 2011, negatif: Rydhmer et al., 1995, Serenius dan Stalder 2004). AFF diatur oleh usia saat pubertas dan praktik manajemen. Dalam hal pertumbuhan sosial, sedikit yang diketahui tentang efek SGE (yaitu, efek genetik pada ADG pen) pada AFF. Baik ADG individu dan pena pasangan dianggap sebagai ciri pertumbuhan, tetapi mereka memiliki sifat genetik yang berbeda (korelasi genetik antara kedua efek hanya 0,38, $P = 0,21$). Dalam penelitian ini, + seleksi SGE menghasilkan AFF yang ditingkatkan. AFF dari + SGE sows adalah 347 d, yaitu, 4,6 d lebih pendek daripada sapi SGE ($P = 0,04$, SEM = 1,1). Dalam penelitian ini, kami bertujuan untuk menjaga pengaruh manajemen pertanian pada variasi AFF yang rendah dengan menugaskan sapinya sama dengan kelompok seleksi, dan akibatnya manajemen peternakan tidak berbeda secara signifikan antara + SGE dan kelompok-kelompok SGE. Gilts dengan muda pada masa pubertas memiliki ekspresi estrus yang lebih tinggi dalam garis genetik (Young, 1995; 1998; Moeller et al., 2004). Induk biasanya mengalami anestesi laktasi, yang diikuti oleh WEI 4-6 hari. Tahap-tahap ini diatur oleh loop umpan balik positif dan negatif dari hormon reproduksi yang disintesis dan disekresikan dari hipotalamus (Soede et al., 2011). Usia yang lebih muda saat

pubertas mengurangi WEI di gilt dan babi (Knauer et al., 2011), yang pada gilirannya mengurangi pemusnahan untuk kegagalan reproduksi. Dalam penelitian ini, WEI + SGE sows (5.4 d) secara signifikan lebih rendah daripada sapi SGE (5,9 d; $P < 0,01$, SEM = 0,08). Berdasarkan hasil ini dan yang dilaporkan oleh Knauer et al. (2011), usia yang lebih muda pada farrowing pertama akan mengurangi WEI. Oleh karena itu, pemilihan + SGE akan menghasilkan usia yang lebih muda pada first faring dan WEI yang lebih pendek. Penghambatan hormon luteinizing selama laktasi mempengaruhi pertumbuhan folikel dan memulai kembali aktivitas ovarium setelah penyapihan (Shaw dan Foxcroft 1985; Quesnel et al., 1998). Mekanisme umpan balik positif estradiol ditunjukkan untuk meningkatkan kemampuan induk babi untuk mencapai lonjakan hormon luteinizing yang cukup (Sesti dan Britt 1993). Hasil kami menunjukkan bahwa penting untuk mempertimbangkan SGE sebagai fitur biologis, mirip dengan perilaku estrus dan ovulasi.

Kesimpulan

Pemilihan SGE positif pada pertumbuhan babi meningkatkan kinerja reproduksi mereka, seperti yang ditunjukkan oleh jumlah anak babi yang dilahirkan lebih tinggi. Selain itu, seleksi untuk SGE positif meningkatkan efisiensi reproduksi secara keseluruhan / seumur hidup dengan mengurangi usia pada pertama kali, panjang kehamilan, dan menyapih ke interval estrus. Hasil ini menunjukkan peluang untuk meningkatkan kinerja reproduksi induk babi hidup melalui seleksi untuk efek genetik sosial yang lebih tinggi pada tingkat pertumbuhan.

Ucapan terima kasih

Pekerjaan ini didukung oleh Institut Ilmu Hewan Nasional, Administrasi Pembangunan Pedesaan di Korea, dan merupakan bagian dari proyek internal (PJ00997101), "Pengembangan metode pemuliaan babi termasuk interaksi sosial."

Kontribusi penulis

JKH melakukan percobaan (desain), interpretasi data dan penulisan naskah. YMK, KHC dan JCP melakukan beberapa penulisan naskah. DHL berpartisipasi dalam desain percobaan. Semua penulis membaca dan menyetujui naskah akhir.

Konflik kepentingan

Para penulis menyatakan bahwa mereka tidak memiliki kepentingan yang bersaing.

Referensi

Barnett J, Hemsworth P, Cronin G, Jongman E, Hutson G. 2001. Tinjauan masalah kesejahteraan untuk babi dan babi dalam hubungannya dengan perumahan. *Aust J Agric Res*, 52: 1-28. Bergsma R, Kanis E, Knol EF, Bijma P. 2008. Kontribusi efek sosial untuk variasi yang diwariskan dalam menyelesaikan ciri-ciri babi domestik (Sus scrofa). *Genetika*, 178: 1559-1570. Bergsma R, Mathur P, Kanis E, Verstegen M, Knol E, Van Arendonk J. 2013. Korelasi genetik antara kinerja laktasi dan tumbuh-finishing ciri pada babi. *J Anim Sci*, 91: 3601-3611. Bijma P, Muir WM, Van Arendonk JA. 2007. Pemilihan multilevel 1: genetika kuantitatif pewarisan dan respons terhadap seleksi. *Genetika*, 175: 277-288. Brown JA, Seddon YM. 2014. Kelompok atau kios: Apa yang dikatakan sains? *Sci. Etika* 1: 6. Bunter K, Lewis C, Newman S. 2015. Efek genetik sosial memengaruhi kinerja reproduktif dari induk babi. *J Anim Sci*, 93: 3783-3793. Camerlink I, Turner SP, Bijma P, Bolhuis JE. 2013. Efek genetik tidak langsung dan kondisi perumahan dalam kaitannya dengan perilaku agresif pada babi. *PloS satu*, 8: e65136. Camerlink I, Ursinus WW, Bijma P, Kemp B, Bolhuis JE. 2015. Efek genetik tidak langsung untuk tingkat pertumbuhan pada babi domestik mengubah perilaku menggigit agresif dan manipulatif. *Behav Genet*, 45: 117-126. D'Eath R, Conington J, Lawrence A, Olsson I, Sandøe P. 2010. Pemuliaan untuk perubahan perilaku pada hewan ternak: pertimbangan praktis, ekonomis dan etis. *Kesejahteraan Hewan*, 19: 17-27. DeNise R, Irvin K, Swiger L, Plimpton R. 1983. Seleksi untuk peningkatan leanness Yorkshire swine. IV. Respon tidak langsung dari karkas, efisiensi pemuliaan dan sifat-sifat sampah preweaning. *J Anim Sci*, 56: 551-559. Ducos A, Bidanel J. 1996. Korelasi genetik antara produksi dan sifat-sifat reproduksi yang diukur di peternakan, di babi Landrace Putih Besar dan Prancis keturunan. *J Anim Breed Genet*, 113: 493-504. Johansson K. 1981. Beberapa catatan mengenai kemungkinan

genetik untuk meningkatkan kesuburan babi. *Livest Prod Sci*, 8: 431-447. Knauer M, Cassady J, Newcom D, Lihai MT. 2011. Fenotipik dan korelasi genetik antara emas estrus, pubertas, pertumbuhan, komposisi, dan sifat konformasi struktural dengan langkah-langkah reproduksi litter pertama. *J Anim Sci*, 89: 935-942. Meyer K. 2007. WOMBAT — Alat untuk analisis model campuran dalam genetika kuantitatif dengan kemungkinan maksimum terbatas (REML). *J Zhejiang Univ Sci B*, 8: 815-821. Moeller S, Goodwin R, Johnson R, Mabry J, Baas T, Robison O. 2004. Dewan Produsen Babi Nasional Maternal Line Program Evaluasi Genetik Nasional: Perbandingan enam garis genetik ibu untuk ukuran produktivitas wanita di atas empat paritas. *J Anim Sci*, 82: 41-53. Moore AJ, Brodie III ED, Serigala JB. 1997. Berinteraksi fenotip dan proses evolusi: I. Efek genetik langsung dan tidak langsung dari interaksi sosial. *Evolusi*, 51 (5): 1352-1362. Quesnel H, Pasquier A, Mounier A, Prunier A. 1998. Pengaruh pembatasan pakan selama laktasi pada hormon gonadotropik dan perkembangan ovarium pada induk primipara. *J Anim Sci*, 76: 856-863. Reimert I, Rodenburg T, Ursinus W, Duijvesteijn N, Camerlink I, Kemp B, Bolhuis J. 2013. Perilaku backtest dan kebaruan babi betina dan dikebiri, dengan nilai-nilai pembiakan sosial divergen untuk pertumbuhan. *J Anim Sci*, 91: 4589-4597. Reimert I, Rodenburg TB, Ursinus WW, Kemp B, Bolhuis JE. 2014. Tanggapan terhadap situasi baru babi pejantan betina dan dikebiri dengan nilai-nilai pembiakan sosial yang berbeda dan klasifikasi backtest yang berbeda di perumahan tandus dan jerami diperkaya. *Appl Anim Behav Sci*, 151: 24-35. Rodenburg T, Bijma P, Ellen E, Bergsma R, De Vries S, Bolhuis J, Kemp B, Van Arendonk J. 2010. Breeding hewan ramah? Meningkatkan kesejahteraan hewan ternak dengan memasukkan efek sosial dalam program pemuliaan. *Kesejahteraan Hewan*, 19: 77-82. Rydhmer L, Lundeheim N, Johansson K. 1995. Parameter genetik untuk sifat reproduksi pada induk dan hubungan dengan pengukuran kinerja. *J Anim Breed Genet*, 112: 33-42. *Anim. Reprod.*, V.14, (Suppl.1), hal.1292-1297. 2017 1297 Sargolzaei M, Iwaisaki H, Colleau JJ. 2006. Prosiding Kongres Dunia ke-8 tentang Genetika yang Berlaku untuk Produksi Ternak. Belo Horizonte; Brasil: 13-18 Agustus. CFC: Alat untuk memantau keragaman genetik; Komunikasi CD-ROM, pp.27-28. Serenius, T. 2004. Genetika efisiensi tabur dalam populasi Landrace Finlandia dan Large White. (Disertasi PhD), Universitas Helsinki, Finlandia, Laporan Penelitian Agrifood, pp.1-42. Serenius T, Stalder K. 2004. Genetika panjang umur produktif dan produktivitas seumur hidup di Finlandia Landrace dan populasi babi Putih Besar. *J Anim Sci*, 82: 3111-3117. Serenius T, Stalder K, Fernando R. 2008. Hubungan genetik dengan umur panjang dengan umur pada mulur pertama, jumlah anak babi disapih, dan menyapih interval inseminasi pada populasi babi Landrace Finlandia. *J Animal Sci*, 86: 3324-3329. Sesti L, Britt JH. 1993. Pengaruh tahap laktasi, hormon pelepas hormon eksogen luteinizing, dan menyusui pada estrus, umpan balik positif dari hormon luteinizing, dan ovulasi pada sapi yang diobati dengan estrogen. *J Anim Sci*, 71: 989-998. Shaw H, Foxcroft G. 1985. Hubungan antara LH, FSH dan prolaktin sekresi dan aktivitas reproduksi pada babi yang disapih. *J Reprod Fertil*, 75: 17-28. Soede N, Langendijk P, Kemp B. 2011. Siklus reproduksi pada babi. *Anim Reprod Sci*, 124: 251-258. Stalder KJ, RC Lacy, Cross TL, Conatser GE. 2003. Dampak keuangan dari paritas rata-rata perempuan yang dimusnahkan dalam operasi breed-to-wean swine dengan menggunakan analisis nilai bersih gilt net. *J Swine Health Prod*, 11: 69-74. Sterning M, Rydhmer L, Eliasson-Selling L. 1998. Hubungan antara usia saat pubertas dan interval dari menyapih ke estrus dan antara tanda-tanda estrus pada masa pubertas dan setelah penyapihan pertama pada babi. *J Anim Sci*, 76: 353-359. Tuchscherer M, Kanitz E, Otten W, Tuchscherer A. 2002. Pengaruh stres prenatal pada respon imun seluler dan humoral pada babi neonatal. *Vet Immunol Immunopathol*, 86: 195-203. Young L. 1995. Reproduksi F1 Meishan, Fengjing, Minzhu, dan Duroc gilt dan babi. *J Anim Sci*, 73: 711- 721. Young L. 1998. Reproduksi 3/4 White Composite dan 1/4 Duroc, 1/4 Meishan, 1/4 Fengjing, atau 1/4 Minzhu gilt dan babi. *J Anim Sci*, 76: 1559-1567.

Pengaruh asam klorogenik pada pematangan dan pempupukan oosit babi dan perkembangan embrio mereka dengan kultur sel granulosa sapi pembanding

Hélder Patrício Nunes¹, Selma Furnas, Marleen Dinis, Alfredo Borba, Joaquim Moreira da Silva

University of the Azores, Fakultas Ilmu Agraria, Departemen Animal Reproduction, CITA-A, Angra do Heroísmo, Portugal.

Abstrak

Asam klorogenik (CGA) memainkan beberapa peran biologis, tetapi tidak memiliki penelitian yang menunjukkan bagaimana senyawa fenolik ini mempengaruhi reproduksi hewan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengevaluasi efek dari konsentrasi CGA yang berbeda pada pematangan oosit bovine dan perkembangan embrio in vitro. Penelitian ini juga mengevaluasi sistem co-culture yang melibatkan sel granulosa sapi (BGC) dari diberi makan dengan tanaman yang mengandung CGA, *Pittosporum Undulatum*. Ovarium ditemukan setelah pembantaian dan oosit dikeluarkan, matang, dibekukan secara in vitro dan dikultur dalam medium yang mengandung CGA dalam 5 konsentrasi yang berbeda 1,25; 2,5; 5; 10; 20 μm dan kelompok kontrol (0 μm) selama tujuh hari. Oosit yang dipilih ($n = 1040$) dimatangkan di salah satu dari 5 kelompok perlakuan atau kontrol. Tingkat kematangan yang secara signifikan lebih rendah ($P < 0,05$) diamati untuk konsentrasi CGA tertinggi 10 μm , dan 20 μm , dibandingkan dengan kelompok kontrol (Kontrol = $93,4 \pm 2,1\%$ vs 10 $\mu\text{m} = 80,9 \pm 2,2\%$; 20 $\mu\text{m} = 77,9 \pm 3,3\%$). Kami mengamati bahwa semakin tinggi konsentrasi CGA yang ada, semakin rendah tingkat pembelahan dan perkembangan setelah 3 dan 7 hari, masing-masing. Diamati bahwa perbedaan signifikan dicatat dalam hal perkembangan embrio yang jelas antara kontrol dan kelompok (20; $51,1 \pm 5,6$ vs $19,4 \pm 2,2\%$). Dalam hal studi yang melibatkan ko-budaya embrio dengan BGC satu-satunya perbedaan yang tercatat melibatkan tingkat blok. Tidak ada perbedaan ($P > 0,05$) yang diidentifikasi antara kelompok kontrol dan eksperimental dalam kaitannya dengan produksi progesteron oleh BGC. Hasil ini menunjukkan bahwa CGA dapat mempengaruhi pematangan oosit dan menghambat perkembangan meiosis dan akibatnya seluruh perkembangan embrio in vitro.

Kata kunci: blastokista, bovine, asam klorogenik, IVF, IVM, *P. undulatum*; progesteron.

Pendahuluan

Chlorogenic acid (CGA) adalah senyawa fenol bioaktif yang dibentuk oleh esterifikasi asam transklamamik (caffeic, coumaric, dan ferulic acid) dengan quinic acid, yang terdiri dari sekelompok isomer terutama 3-O-caffeoylquinic acid (3-CQA), 4-O-caffeoylquinic acid (4-CQA), dan 5-O-caffeoylquinic acid (5-CQA; Hao et al., 2016). Ini didistribusikan secara luas di tanaman seperti kopi, teh, sayuran lain-lain (Gordon dan Wishart, 2010) dan juga *Pittosporum undulatum*, salah satu tanaman penyerang paling sukses dari kepulauan Azores digunakan terutama sebagai bahan pakan alternatif untuk ternak (Lourenço et al., 2011; Nunes et al., 2014). Saat ini satu-satunya CGA yang tersedia secara komersial adalah 5-CQA yang telah dipelajari secara ekstensif karena berbagai sifat farmakologi termasuk anti-karat, anti-oksidan, anti-bakteri, dan anti-virus. Ini juga telah dikaitkan dengan inferensi penyerapan glukosa dan modulasi ekspresi gen enzim antioksidan, di antara kegiatan biologis lainnya (Gugliucci et al., 2009; Liu et al., 2016). Selain sifat-sifat farmakologinya yang telah dijelaskan, CGA juga bertindak pada metabolisme aras cascade asam arakidon yang menghambat siklooksigenase 2 (COX-2; Shan et al., 2009), yang dapat mengganggu fisiologi reproduktif yaitu pada maturasi oosit, serta pembelahan (Calder et al., 2001) dan perkembangan embrio setelah pembuahan (Thatcher et al., 1984). Ini mungkin karena efek langsung dari CGA pada oosit atau efek tidak langsung pada metabolisme sel granulosa yang mengelilingi oosit. Sebagaimana diketahui, proses pematangan adalah salah satu tahapan terpenting dalam produksi embrio in vitro karena pada saat inilah oosit mendapatkan kapasitas untuk dibuahi. Beberapa perubahan nuklir terjadi, termasuk serangkaian aktivitas biokimia sitoplasma yang dibentuk oleh kaskade kompleks fosforilasi dan dephosphorisasi protein yang terlibat dalam pengaturan meiosis (Meinecke et al., 2001). Di antara yang menonjol keluarga mitogen activated protein kinase (MAPK) (Tian et al., 2002), memicu jalur transduksi sinyal. Selama pematangan, protein maturation-promote factor (MPF) kompleks dan MAPK atau / dan jalur sinyal-diatur ekstraseluler kinase (ERK)

terlibat dalam pengaturan berbagai jalur pertumbuhan dan diferensiasi melalui beberapa kaskade fosforilasi (Katz et al., 2007).

Dalam penelitian ini, pematangan oosit dan IVF dilakukan bersamaan dengan kultur sel granulosa yang diperoleh dari makan sapi dengan dan tanpa *P. undulatum*. Selanjutnya, pematangan oosit dan kultur embrio in vitro dilakukan menggunakan berbagai konsentrasi CGA tanpa ko-budaya. Kadar progesteron yang diproduksi oleh sel granulosa dari kedua kelompok hewan (dengan dan tanpa *P. undulatum*) juga dievaluasi.

Bahan dan Metode

Desain

Eksperimen Percobaan 1 dirancang untuk menguji pengaruh CGA pada pematangan oosit dan perkembangan embrio yang diproduksi in vitro di mana pematangan dan budaya media dilengkapi dengan konsentrasi CGA yang berbeda. Untuk tujuan tersebut, setelah pengumpulan, oocytes (n = 1040) dibagi menjadi enam kelompok: 0 (kontrol, tanpa CGA; n = 221); 1,25 μm (n = 170); 2,5 μm (n = 130); 5 μm (n = 164), 10 μm (n = 163) dan 20 μm (n = 192). Kelompok-kelompok tersebut dimatangkan tanpa ko-kultur selama 24 jam seperti dijelaskan sebelumnya diikuti oleh IVF. Embrio dugaan diperiksa pada hari ke 3 untuk pembelahan dan pada hari ke 7 untuk pengembangan morula / blastocyst,

dalam percobaan 2, media tidak dilengkapi dengan CGA, tetapi embrio diproduksi dalam ko-kultur menggunakan sel granulosa sapi pulih dari pakan hewan selama enam minggu dengan *P. undulatum* (kelompok eksperimen) dan tanpa (kelompok kontrol). Untuk kontrol dan kelompok eksperimen, 150 dan 218 oosit yang masing-masing diproses.

kimia

Semua bahan kimia dan reagen yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Sigma-Aldrich (St Louis, Mo, USA) kecuali dinyatakan lain.

Ovarium

Ovarium diperoleh di rumah potong hewan setempat dari sapi yang disembelih, dipangkas dari jaringan yang menempel dan diangkat ke persalinan. atory dalam larutan buffer fosfat (DPBS) Dulbecco pada suhu 37 ° C dalam waktu 2 jam setelah pematangan. Setibanya di laboratorium, semua ovarium dibilas sekali dengan alkohol 70%, dan diikuti dengan pencucian dengan DPBS hangat yang hangat.

Koleksi oosit yang belum matang

Kompleks oosit cumulus (COC) dikumpulkan oleh aspirasi dari folikel antral (diameter 2 - 8 mm) dengan jarum 18-gauge. Metode aspirasi diterapkan untuk menghindari gangguan COC; jarum dan alat suntik yang prima dengan sekitar 0,25 - 0,5 ml media cuci yang terdiri dari TCM 199 buffered dengan Hepes, dilengkapi dengan 2% Fetal Bovine Serum (FBS), 0,3 mg / ml glutamin dan 50 μg / ml gentamycin. COC dan cairan folikuler secara perlahan dikeluarkan ke dalam tabung 10 ml dan dipertahankan di sana selama minimal 5 menit untuk memungkinkan sedimentasi COCs. Endapan itu dimasukkan ke dalam cawan petri steril untuk evaluasi morfologi COC. COC berkualitas baik yang ditutupi oleh setidaknya empat lapisan sel kumulus yang dipadatkan dan ooplasma yang digranulasi secara merata dipilih untuk pematangan (Santos et al., 2008).

Produksi embrio in vitro

COC segar dibagi secara acak dalam kelompok dan dicuci dua kali dalam medium TCM-199 Hepes yang dilengkapi dengan 2% FBS, 0,3 mg / ml glutamin, 50 μg / ml gentamisin dan matang dalam TCM-199 yang dilengkapi dengan 10% FBS, 5 μg / ml atau 0,02 IU / ml FSH-LH (Stimufol, Belgia), 1 μg / ml estradiol-17 β , 0,15 mg / ml glutamin, 22 μg / ml natrium piruvat, 50 μg / ml gentamycin. Larutan stok CGA disiapkan dalam 0,2% dimetil sulfoksida (DMSO) dan diencerkan dalam medium pematangan mulai dari 7 μg / ml hingga 1,4 μg / ml CGA. Konsentrasi akhir per kelompok terdiri dari 1,25 μm , 2,5 μm , 5 μm , 10 μm , 20 μm . Setelah 24 jam di bawah 5% CO₂ dalam suasana lembab di 38.5oC, oocytes dianggap matang dengan cara ekspansi cumulus ditempatkan

untuk inseminasi dalam pemupukan TALP menengah (Faheem et al., 2011). Secara singkat, semen dicair dicuci tiga kali dengan sentrifugasi, dua kali dalam media sperma-TALP (4 ml setiap kali) dan sekali dalam medium IVF-TALP dilengkapi dengan 10 µg / ml heparin, 6 mg / ml bovine serum albumin (BSA, pada dasarnya lemak asam bebas), 22 µg / ml Na-piruvat, 50 µg / ml gentamycin dan 20 µg / ml nistatin. Setelah mengeluarkan supernatan, pelet sperma dihomogenkan dengan 0,25-0,5 ml medium IVF-TALP yang tersisa untuk menyesuaikan konsentrasi sperma menjadi 1×10^6 sperma / ml. Oosit dan sperma dikulturkan dalam 50 µl media pemupukan (10-15 oosit / droplet) selama 22-24 jam pada 38,5°C dalam 5% CO₂ di udara. Zigot dugaan digosok secara terpisah oleh vortex, dicuci dan dibiakkan dalam TCM-199 dengan Hepes yang disuplementasi dengan 3 mg / ml BSA (Fr. V), 22 µg / ml Na-piruvat, 10 µl / ml NEAA (MEM, amino non-esensial asam), 20 µl / ml EAA (BME, asam amino esensial), 50 µg / ml gentamycin, 20 µg / ml nistatin dan CGA dalam konsentrasi yang berbeda: 0 (kelompok kontrol / tanpa CGA), 1,25 µm, 2,5 µm, 5 µm, 10 µm, 20 µm. Semua zigot dugaan diinkubasi pada 38,5°C dalam 5% CO₂ di udara. Tingkat pembelahan ditentukan setelah 3 hari pemupukan (hari 0) dan perkembangan embrio dievaluasi pada hari ke 7 budaya.

Kultur sel granulosa Bovine Kultur sel

monolayer granulosa untuk ko-kultur disiapkan pada hari pematangan oosit, di mana sel granulosa disedot dari folikel folikel folikel 2-8 mm dari sapi yang diberi makan dengan P. undulatum (kelompok eksperimen) atau hewan. tidak diberi makan dengan tanaman ini (kelompok kontrol). Cairan folikular kemudian disentrifugasi pada 200 x g selama 10 menit, dan kembali disuspensikan pelet dalam medium kultur granulosa, yang terdiri dari TCM-199 tanpa Hepes yang mengandung 10% FBS, 50 µg / ml gentamycin dan 20 µg / ml nistatin. Gumpalan sel secara mekanis dipecah oleh aspirasi berulang melalui jarum 18 gauge yang melekat pada jarum suntik 5 ml. Konsentrasi sel dan viabilitas ditentukan dan diukur menggunakan haemocytometer setelah pewarnaan sel dengan metode Trypan Blue (0,4%, b / v) dan disesuaikan dengan 1×10^6 cells / ml dengan menambahkan media kultur granulosa, TCM-199 tanpa Hepes (M5017) dan gentamisin (5 µg / L gentamycin). Tetes 100 µl dari suspensi encer ini ditempatkan dalam cawan Petri 60 mm (Nunc®, Denmark) ditutupi dengan minyak mineral, yang memungkinkan monolayer konfluen sel yang akan terbentuk di dasar tetesan selama 2 hari berikutnya sebelum zigot ditransfer. Setengah dari media digantikan sebelum menempatkan embrio dalam ko-kultur dan setiap 48 jam. Sel dari kedua kelompok ini digunakan secara terpisah untuk menghasilkan embrio, serta, untuk mengevaluasi kemampuan mereka untuk menghasilkan progesteron. Untuk tujuan tersebut sel-sel dibagi menjadi tiga labu kultur dalam konsentrasi 1×10^6 sel / ml, dalam 5 ml dan dibudidayakan Hasil selama 24, 48 dan 72 jam. Setelah itu, aliquot supernatan dari 1 ml dikumpulkan secara terpisah dari masing-masing labu dan pematangan in vitro dan perkembangan embrio tanpa disimpan pada -20°C untuk penentuan P4 lebih lanjut menggunakan sel ko-kultur Metode Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Progesterone ELISA kit, K0299, Abnova®). Dalam percobaan 1, perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$) dalam tingkat pematangan diamati antara analisis statistik kelompok dengan konsentrasi tinggi CGA (20 µm) dan

Dalam percobaan 1 data dianalisis dengan analisis satu arah varians (ANOVA) dan dinyatakan sebagai mean \pm standard error of mean (SEM) dihitung dari oosit yang dikumpulkan untuk setiap kelompok. Data persentil dinormalisasi melalui transformasi busur sinus dan kemudian diserahkan ke uji homogenitas, diikuti oleh analisis varians (ANOVA satu arah) dengan uji post-hoc Fisher's least significant difference (LSD). Data dari percobaan 2 dianalisis oleh Student's t-test dan dinyatakan sebagai rata-rata \pm standard error mean (SEM) dihitung dari oosit yang dikumpulkan untuk masing-masing kelompok. Perbedaan dalam konsentrasi progesteron dalam media kultur granulosa ditentukan dengan pengukuran ulang analisis varians (ANOVA). Semua analisis dilakukan menggunakan IBM SPSS v.20 Statistics Program (SPSS Inc. Chicago, IL). Untuk semua analisis kelompok lain (0, 1,25, 2,5, 5 µm). Berkaitan dengan kelompok konsentrasi CGA kekasih (0, 1,25, 2,5, 5 µm), tidak ada perbedaan statistik yang diamati (Tabel 1) dalam salah satu parameter yang diteliti. Perbedaan statistik ($P < 0,05$) diamati hanya untuk konsentrasi CGA tertinggi. Rasio pemblokiran embrio tidak dipengaruhi oleh CGA, dan tidak ada perbedaan statistik yang diamati di antara kelompok.

Suplemen CGA media budaya menyebabkan dampak negatif pada perkembangan embrio. Tidak ada perbedaan statistik yang diamati antara CGA = 20 μm ($19,4 \pm 2,2\%$) dan CGA = 10 μm ($21,2 \pm 1,2\%$), kedua konsentrasi ini menghasilkan nilai yang secara statistik lebih rendah bila dibandingkan dengan konsentrasi CGA terendah yang digunakan. Produksi embrio tertinggi diamati selama CGA = 0 dan 1,25 μm , perbandingan dianggap berbeda secara signifikan menghasilkan $51,1 \pm 5,6$ dan $50,5 \pm 3,3$ persentase ketika nilai $P \leq 0,05$. menghasilkan embrio.

Tabel 1. Tingkat perkembangan embrionik in vitro dari berbagai konsentrasi CGA.

Concentration CGA (μm)	No. of oocytes	Maturation (%)	Cleavage (%)	Blocked (%)	Developed embryo (%)
0	221	$93.4 \pm 2.1^{a,b}$	78.3 ± 4.8^a	27.1 ± 4.4^a	51.1 ± 5.6^a
1.25	170	$94.1 \pm 2.0^{a,b}$	73.8 ± 3.4^a	22.0 ± 3.8^a	50.5 ± 3.3^a
2.5	130	$91.0 \pm 0.7^{a,b}$	67.5 ± 2.4^a	26.6 ± 0.8^a	$40,5 \pm 1.4^{a,b}$
5	164	$86.6 \pm 0.7^{b,c}$	67.4 ± 3.7^a	33.2 ± 3.6^a	$34.2 \pm 3.7^{b,c}$
10	163	$80.9 \pm 2.2^{c,d}$	$54.6 \pm 1.9^{a,b}$	33.1 ± 0.7^a	$21.2 \pm 1.2^{b,c}$
20	192	77.9 ± 3.3^d	48.75 ± 1.8^b	29.4 ± 1.9^a	19.4 ± 2.2^c

Angka dalam kolom yang sama dengan huruf berbeda (a, b, c, d) berbeda secara signifikan pada $P < 0,05$; Data dinyatakan dalam persentase (%) sebagai rata-rata \pm SEM, kesalahan standar sarana; embrio yang dikembangkan diklasifikasikan sebagai morula, tahap awal blastokista dan blastokista.

Produksi embrio dalam ko-kultur

Ketika ko-kultur sel granulosa dan oosit diamati untuk pematangan dan perkembangan lanjutan setelah IVF, terbukti bahwa tingkat pertumbuhan pematangan, pembelahan dan embrio secara statistik sama ketika dibudidayakan dalam sel granulosa yang diperoleh dari hewan yang diberi makan dengan dan diberi makan tanpa P. undulatum (Tabel 2), menjadi $52,5 \pm 1,7\%$ untuk kontrol vs $43,1 \pm 1,4\%$ untuk kelompok eksperimen. Namun, diamati pada Tabel 2 bahwa sejumlah embrio yang diblokir dalam kelompok eksperimen ($33,1 \pm 3,4\%$) lebih tinggi bila dibandingkan dengan kelompok kontrol ($10,7 \pm 1,6\%$), karena perbedaan tersebut secara statistik signifikan ($P < 0,05$).

Produksi progesteron oleh medium berbiji sel granulosa sapi (BGC)

Progesteron yang diproduksi oleh sel granulosa setelah 72 jam kultur menghasilkan konsentrasi yang sama di antara kedua kelompok, yaitu $7,6 \pm 0,2$ ng / ml $8,6 \pm 0,8$ ng / ml, masing-masing untuk kontrol dan eksperimental kelompok. Dalam setiap kelompok, 1×10^6 sel ditempatkan dalam drop cawan petri (Tabel 3).

Tabel 2. Tingkat perkembangan embrionik in vitro kelompok eksperimen dan kontrol dengan sel granulosa sapi.

Group	No. of oocytes	Maturation (%)	Cleavage (%)	Blocked (%)	Developed embryo (%)
Control	150	90.4 ± 0.5^a	94.5 ± 2.8^a	10.7 ± 1.6^a	52.5 ± 1.7^a
Experimental	218	93.7 ± 1.8^a	91.4 ± 3.8^a	33.1 ± 3.4^b	43.1 ± 4.4^a

Angka dalam kolom yang sama dengan huruf berbeda (a, b) berbeda secara signifikan pada $P < 0,05$; Data dinyatakan dalam persentase (%) sebagai rata-rata \pm SEM, kesalahan standar sarana; embrio yang dikembangkan diklasifikasikan sebagai morula, tahap awal blastokista dan blastokista.

Tabel 3. Kadar progesteron dalam media kultur sel granulosa selama 72 jam.

Culture hours	Progesterone concentration (ng/ml)	
	Control group	Experimental group
24	6.5 ± 1.3 ^a	7.8 ± 1.0 ^a
48	8.1 ± 1.0 ^a	6.9 ± 1.6 ^a
72	7.6 ± 0.2 ^a	8.6 ± 0.8 ^a

Hasil mewakili sebagai rata-rata ± SEM. Huruf yang berbeda dalam kolom yang sama secara statistik berbeda ($P < 0,05$).

Diskusi

CGA properti belum sepenuhnya dipelajari, sepengetahuan kami ini adalah studi pertama yang melaporkan efek dari konsentrasi yang berbeda pada pematangan oosit dan perkembangan embrio pada sapi. Dalam penelitian ini, percobaan 1, ketika konsentrasi 5µm CGA atau lebih tinggi ditambahkan ke pematangan menengah penurunan tingkat pematangan oosit diamati. Meskipun tidak ada bukti ilmiah dalam penelitian ini yang menunjukkan bahwa pengurangan ini disebabkan oleh penekanan CGA dari ERK's / MAPK fosforilasi protein, kedua Kang et al. (2011) seseorang dapat berspekulasi bahwa ini adalah alasan yang menyebabkan menghambat perkembangan meiosis yang mengarah ke defisiensi pematangan oosit.

Untuk kelompok yang terkait dengan konsentrasi yang lebih rendah (2,5 µm dan 1,25 µm dan 0 µm) tidak ada perbedaan yang diamati. Ini membuat kita percaya bahwa konsentrasi CGA ini tidak cukup untuk menghasilkan interferensi di jalur ERK / MAPK.

Beberapa penelitian menunjukkan kematian sel yang lebih tinggi untuk embrio yang dihasilkan secara in vitro hingga tahap blastokista karena kurangnya beberapa faktor parakrin dalam kondisi in vitro (Pakrasi dan Jain, 2008). Dengan penelitian ini kita dapat memverifikasi bahwa konsentrasi tinggi CGA (10 dan 20 µm) di media kultur menyebabkan laju pembelahan dan perkembangan embrio menurun ketika dibandingkan dengan kelompok kontrol (0 µm, tanpa penambahan CGA) atau dengan hasil dari percobaan 2. Informasi ini mengarahkan kita untuk percaya bahwa tingkat kematian sel dalam dua periode ini lebih besar bila dibandingkan dengan embrio non-eksperimental in vitro terutama karena manipulasi CGA. Hanya embrio yang dibagi di luar 16 sel dianggap tidak terhalang, yang ditemukan berbanding terbalik dengan jumlah CGA yang ditambahkan ke pematangan / media kultur. Meskipun mekanisme dimana CGA mengurangi perkembangan embrio tidak sepenuhnya dipahami, hipotesis bergerak ke arah efek siklooksigenase (COXs) dan khususnya efek ekspresi COX-2, yang sangat dipengaruhi oleh berbagai rangsangan dan diamati selama periode tertentu. perkembangan embrio. Hal ini dapat terjadi melalui sinyal interdiksi ERK dan p38 MAPK yang diperlukan untuk perkembangan embrio bovine (Madan et al., 2005), yaitu untuk produksi prostaglandin yang memainkan peran penting dalam perkembangan embrio dengan meningkatkan jumlah sel (Pakrasi dan Jain, 2008).

Dalam produksi embrio dikultivasi dengan BGC (percobaan 2), bertentangan dengan harapan, tidak ada perbedaan yang diamati antara kontrol (menggunakan sel granulosa pulih dari sapi tanpa P. undulatum di makan) dan kelompok eksperimental (menggunakan sel granulosa pulih dari sapi pakan dengan P. undulatum) dalam kaitannya dengan pembelahan dan perkembangan embrio. Hasil kami membandingkan kedua kelompok adalah serupa dan ini dapat disebabkan oleh fakta bahwa CGA yang ada di P. undulatum tidak terakumulasi dalam BCG. Metabolisme CGA, serta, bioavailabilitas di ruminansia masih belum diketahui; Namun, diketahui bahwa dalam monogastrik hanya sebagian kecil dari CGA yang diserap tanpa hidrolisis dan sekitar 1% dari CGA yang dicerna ditemukan utuh (Oliveira dan Bastos, 2011). Mengingat kekhususan fisiologi pencernaan sapi, kami percaya bahwa bioavailabilitas CGA masih lebih rendah dan tidak cukup untuk terakumulasi dalam sel granulosa. Singkatnya, penambahan CGA pada konsentrasi tinggi, yaitu, lebih dari 20 µm ke pematangan dan media kultur, dapat

mempengaruhi pematangan oosit, menghambat perkembangan meiosis dan akibatnya semua perkembangan embrio in vitro.

Ucapan Terima Kasih

Penulis pertama dibiayai oleh Azorean Agency for Science and Technology, Grant BD M3.1.2 / F / 012/2011. CITA-A juga diakui sepenuhnya.

Referensi

Calder MD, Caveney AN, Westhusin ME, Watson AJ. 2001. Cyclooxygenase-2 dan prostaglandin E2 (PGE2) RNA messenger reseptor dipengaruhi oleh waktu pematangan oosit dan kualitas kompleks kumulus-oosit, dan PGE2 menginduksi ekspansi moderat dari cumulus bovin in vitro. *Biol Reprod*, 65: 135-140. Faheem MS, Carvalhais I, Chaveiro A, Moreira da Silva F. 2011. Pemupukan oosit in vitro dan perkembangan embrio berikutnya setelah kriopreservasi jaringan ovarium sapi, menggunakan pendekatan efektif untuk pengumpulan oosit. *Anim Reprod Sci*, 125: 49-55. Gordon MH, Wishart K. 2010. Pengaruh asam klorogenat dan albumin serum bovin pada stabilitas oksidatif lipoprotein densitas rendah secara in vitro. *J Agric Food Chem*, 58: 5828-5833. Gugliucci A, Bastos DHM, Schulze J, Souza MFF. 2009. Asam caffeic dan chlorogenic dalam ekstrak *Ilex paraguariensis* adalah penghambat utama pembentukan AGE oleh methylglyoxal pada protein model. *Fitoterapia*, 80: 339-344. Hao Y, Gao R, Liu D, He G, Tang Y, Guo Z. Ekstraksi selektif dan penentuanklorogenik Nunes et al. IVF dan embrio perkembangan embrio menggunakan CGA di media. asam dalam jus buah menggunakan nanopartikel magnetik hidrofilik. *Food Chem*, 200: 215-222. Kang NJ, Shin SH, Lee HJ, Lee KW. 2011. Polifenol sebagai inhibitor molekuler kecil dari sinyal kaskade dalam karsinogenesis. *Pharmacol Ther*, 130: 310- 324. Katz M, Amit I, Yarden Y. 2007. Peraturan MAPK oleh faktor pertumbuhan dan reseptor tirosin kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1773: 1161-1176. Liu Q, Zhao Y, Pan J, Van der Bruggen B, Shen J. 2016. Sebuah dasar kitosan baru molekul membran yang dicetak untuk pemisahan selektif asam klorogenik. *Sep Purif Technol*, 164: 70-80. Lourenço P, Medeiros V, Gil A, Silva L. 2011. Distribusi, habitat dan biomassa *Pittosporum undulatum*, penyerang tanaman kayu yang paling penting di Kepulauan Azores. *Untuk Ecol Manage*, 262: 178- 187. Madan P, Calder MD, Watson AJ. 2005. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) blokade embriogenesis preimplantasi sapi memerlukan penghambatan jalur p38 dan jalur ekstraseluler sinyal-diatur kinase (ERK). *Reproduksi*, 130: 41-51. Meinecke B, Janas U, Podhajsky E, Meineck-Tillmann S. 2001. Aktivitas Histone H1 dan MAP kinase dalam oosit sapi berikut penghambatan sintesis protein. *Reprod Domest Anim*, 36: 183-188. Nunes H, Falé PL, Duarte MF, Serralheiro ML, Borba Alfredo ES, Silva JFM. 2014. *Pittosporum undulatum* dan *hedychium gardnerianum* nilai gizi dan metabolit sekunder pada kinerja reproduksi ternak. *Int J Pure Appl Sci Technol*, 22: 1-9. Oliveira DM, Bastos DHM. 2011. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. *Quim Nova*, 34: 1051-1056. Pakrasi PL, AK Jain. 2008. Cyclooxygenase-2-endogen prostacyclin menurunkan apoptosis dan meningkatkan viabilitas embrio pada tikus. *Prostaglandin, Leukotrien dan Asam Lemak Esensial*, 79: 27-33. Santos P, Chaveiro A, Simões N, Moreira da Silva F. 2008. Kualitas oosit Bovine dalam kaitannya dengan karakteristik ultrastructural zona pelusida, penetrasi polispermik dan kompetensi perkembangan. *Reprod Domest Anim*, 43: 685-689. Shan J, Fu J, Zhao Z, X Kong, Huang H, Luo L, Yin Z. 2009. Asam klorogenik menghambat ekspresi cyclooxygenase-2 yang diinduksi lipopolisakarida pada sel RAW264.7 melalui penekanan aktivasi NF- κ B dan JNK / AP-1. *Int Immunopharmacol*, 9: 1042-1048. Thatcher WW, Wolfens D, Curl JS, Rico LE, Knickerbocker JJ, Bazer FW, Drost M. 1984. Dinamika prostaglandin yang terkait dengan pengembangan konsepus sapi. *Anim Reprod Sci*, 7: 149-176. Tian XC, Lonergan P, Jeong BS, Evans ACO, Yang X. 2002. Asosiasi MPF, MAPK, dan dinamika perkembangan nuklir selama aktivasi oosit bovin muda dan usia. *Mol Reprod Dev*, 62: 132-138.

Kriopreservasi embrio yang diproduksi secara in vitro: tantangan untuk penerapan komersial

Bruno Valente Sanches¹, Amanda Fonseca Zangirolamo¹, Nathalia Covre da Silva¹, Fabio Morotti¹, Marcelo Marcondes Seneda^{2,3}

¹Cogent IVF, LLC, Hermiston, ATAU 97838, AS. ²Laboratório de Reprodução Hewan, DCV-CCA-UEL, Londrina, PR, Brasil.

Abstrak

Dalam beberapa tahun terakhir, tingginya permintaan untuk produksi embrio telah mengakibatkan kebutuhan untuk mempelajari metode baru untuk membuat kriopreservasi embrio sapi yang diproduksi secara in vitro lebih efisien. Meskipun keuntungan yang ditawarkan oleh produksi embrio in vitro (IVEP), tantangan utama untuk penyebaran yang lebih besar adalah untuk meningkatkan kelangsungan hidup embrio setelah kriopreservasi. Embrio yang diproduksi secara in vitro kurang tahan terhadap kriopreservasi dibandingkan dengan yang diproduksi in vivo, yang disebabkan oleh akumulasi lipid yang lebih tinggi dalam sel mereka, di antara faktor-faktor lainnya. Dalam konteks ini, perubahan dalam kondisi budaya seperti penambahan zat kimia lipolitik dan penyesuaian serum janin anak dalam media telah diusulkan untuk menurunkan jumlah lipid dalam embrio. Beberapa tahun yang lalu, vitrifikasi memungkinkan hasil yang baik untuk embrio yang diproduksi secara in vitro (IVP) karena kesederhanaan, kecepatan dan biaya rendah. Baru-baru ini, teknik lain yang diterapkan untuk menyederhanakan langkah-langkah embrio pasca-thawing rehidrasi in vivo, transfer langsung (DT), adalah strategi yang telah terbukti menarik dalam membantu mengatasi keterbatasan kriopreservasi embrio yang dihasilkan secara in vitro. DT telah dilakukan oleh laboratorium komersial, memastikan kelangsungan hidup embrio yang baik setelah pencairan. Namun, pembatasan komersial dan operasional mencegah penggunaan teknik ini dalam skala besar. Dengan demikian, ulasan ini bertujuan untuk membahas penggunaan strategi untuk meningkatkan kapasitas ketahanan pasca kriopreservasi dan aspek-aspek yang harus diatasi sehingga kriopreservasi embrio IVP menjadi teknik yang mapan dan dapat diterapkan secara komersial selain menyajikan pedoman baru untuk transfer embrio. (ET) program dari pilihan penerima yang lebih baik.

Kata kunci: bovine, pembatasan komersial, kriopreservasi, embrio yang diproduksi secara in vitro, sapi penerima.

Pendahuluan

Selama tahun 2015, hampir 700.000 embrio IVP diproduksi, melebihi untuk pertama kalinya jumlah embrio sapi yang diproduksi in vivo. Dalam konteks ini, 269.353 embrio sapi OPU IVP dipindahkan di Brasil saja (Perry, 2016), yang dianggap sebagai produsen embrio bovine terbesar di dunia. Situasi ini secara langsung terkait dengan dominasi sapi *Bos indicus*. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa Zebu betina, ketika diserahkan kepada pengambilan telur (OPU) dipandu oleh ultrasonografi transvaginal, memiliki jumlah oosit yang lebih tinggi yang disedot dari *Bos taurus* betina (Segerson et al., 1984; Silva-Santos et al., 2011). Fitur ini mendukung produksi embrio in vitro skala besar (IVEP) pada sapi perah dan sapi potong (Pontes et al., 2011).

Lebih lanjut, IVEP memiliki kondisi yang menguntungkan untuk penerapannya pada sapi indukan *Bos indicus*, karena hewan ini, selain sebagai donor oosit yang baik, diadaptasikan ke iklim tropis dan dapat menghasilkan susu bahkan di bawah kondisi suhu tinggi (Marinho et al., 2015). Keuntungan lain adalah kenyataan bahwa embrio lebih tahan daripada gamet ketika mengalami suhu tubuh yang tinggi karena stres termal (Chebel et al., 2008). Dengan demikian, tingkat kehamilan lebih baik dalam transfer embrio (ET) daripada inseminasi buatan (AI) sepanjang tahun (Stewart et al., 2011; Ferreira, 2013).

³Pengarang yang sesuai: mseneda@uel.br Telepon: +55 (43) 3371-5622; Faks: +55 (43) 3371-4063
Diterima: 22 Juni 2017 Diterima: 7 Juli 2017

Selain itu, dalam dekade terakhir, telah terjadi peningkatan yang signifikan dalam produksi embrio-embrio yang dipermasalahkan, terutama karena pencarian perbaikan genetik sapi perah (Pontes et al., 2010). Keuntungan lain dari IVEP dibandingkan dengan metode *in vivo* adalah jumlah yang lebih kecil dari sperma yang layak diperlukan untuk pembuahan dan, oleh karena itu, hasil yang lebih efisien dalam penggunaan semen yang diurutkan berdasarkan jenis kelamin (Pontes et al., 2010; Morotti et al., 2014).

Dalam konteks ini, produksi embrio total kadang-kadang lebih tinggi daripada jumlah embrio yang ditransfer, sehingga investasi dalam penelitian ditingkatkan untuk mengembangkan protokol yang efisien untuk kriopreservasi embrio yang tersisa dalam suatu program (Sanches et al., 2016). Meskipun keuntungan yang diberikan oleh IVEP, tantangan terbesar dari bioteknologi ini adalah resistensi yang lebih rendah terhadap proses kriopreservasi yang hadir embrio ini (Sudano et al., 2011).

Kepekaan yang tinggi terhadap pendinginan embrio *in vitro* dilaporkan disebabkan oleh akumulasi lipid yang lebih besar dalam sel-sel mereka (Abe et al., 2002), disusun dalam bentuk tetesan lipid sitoplasma yang didasari oleh trigliserida (McKeegan dan Sturmey), 2012). Selain itu, ada indikasi bahwa kandungan lipid yang tinggi ini disebabkan oleh medium di mana embrio dibiakkan (Abe et al., 2002; Sanches et al., 2013). Dengan demikian, beberapa strategi untuk meningkatkan kemampuan bertahan hidup pasca kriopreservasi telah dipelajari dan diuji untuk menghasilkan embrio cryotolerant (Sudano et al., 2013).

Di antara teknik-teknik kriopreservasi, vitrifikasi telah digunakan di seluruh dunia (Dode et al., 2013) karena kesederhanaan, kecepatan, dan biaya rendah. Namun, teknik ini memerlukan konsentrasi cryoprotectants yang tinggi di samping orang yang terlatih untuk melakukan evaluasi morfologi kualitas embrio sebelum proses pemuatan (Vajta et al., 1998).

Sebaliknya, Sanches dkk. (2016) menunjukkan bahwa teknik yang digunakan sejak tahun 1990 untuk menyederhanakan langkah rehidrasi pasca-thawing embrio *in vivo* - transfer langsung (DT) - juga dapat digunakan untuk embrio beku *in vitro*. Strategi DT telah terbukti bermanfaat untuk mengatasi keterbatasan kriopreservasi embrio *in vitro*, karena baru-baru ini dilakukan oleh laboratorium komersial, memberikan viabilitas embrio yang baik setelah pencairan.

Pemilihan penerima embrio merupakan langkah penting dalam pelaksanaan program IVEP (Peixoto et al., 2004). Umur, kondisi sanitasi dan gizi, seperti sinkron antara penerima dan tahap embrio, adalah atribut penting untuk dipertimbangkan dalam pilihan penerima embrio (Hasler et al., 1987; Sreenan dan Diskin, 1987; Callesen et al., 1996 ; Jones dan Lamb, 2008). Selain itu, strategi terbaru untuk sinkronisasi estrus / ovulasi dan pemilihan penerima oleh kesuburan telah tercapai (Marinho et al., 2012).

Sebaliknya, masih ada banyak pembatasan komersial dan operasional embrio dan proses cryopreservation bovine IVEP, yang mencegah penggunaannya dalam skala besar. Contohnya termasuk kebutuhan untuk orang yang memenuhi syarat untuk melakukan semua tahap IVEP dan proses kriopreservasi, logistik antara laboratorium dan penerima, serta teknisi yang terlatih di lapangan karena kekhasan pemanasan embrio cryopreserved sebelum transfer (Hasler, 2010; Saragusty dan Arav, 2011).

Oleh karena itu, mengingat pentingnya menerapkan program IVEP dan cryopreservation yang efisien, tinjauan ini bertujuan untuk membahas i) penggunaan strategi untuk meningkatkan kapasitas embrio pasca-kriopreservasi; ii) pilihan penerima dengan kondisi sanitasi / nutrisi yang baik dan karakteristik reproduksi untuk mempertahankan kehamilan yang sehat; dan terakhir, iii) sebuah tim yang mampu melakukan semua tahap IVEP dengan kontrol kualitas yang ketat dan logistik yang diperlukan untuk membuat ET layak di lapangan.

Kriopreservasi embrio sapi

Metode dan perbedaan cryotolerance dalam embrio yang diproduksi in vivo dan in vitro

Proses kriopreservasi embrio adalah aspek yang paling menantang dari bioteknologi embrio, dan meskipun kemajuan dalam beberapa tahun terakhir, hasilnya masih tidak konsisten (Sudano et al., 2013). Selama pembekuan embrio, metode cryopreservation bertujuan untuk menghindari pembentukan kristal es intraseluler dan untuk mengurangi efek racun yang dihasilkan oleh agen cryoprotectant, meminimalkan tekanan osmotik ke sel (Pryor et al., 2009).

Protokol cryopreservation didasarkan pada dua jenis dan konsentrasi tingkat cryoprotectant dan pendinginan (Vajta dan Kuwayama, 2006). Saat ini, pembekuan lambat (klasik) dan vitrifikasi (ultra-cepat) adalah dua metode utama yang digunakan secara komersial untuk kriopreservasi embrio IVEP (Saragusty dan Arav, 2011).

Vitrifikasi adalah teknik dominan yang digunakan untuk IVEP (Dode et al., 2013) karena menjadi metode yang sederhana, cepat dan biaya rendah (Sanches et al., 2016). Dalam metode ini, larutan osmolaritas tinggi digunakan sehingga air intraseluler embrio keluar dengan cepat, mendehidrasi sel embrio dan membuatnya permeabel ke krioprotektan. Dengan demikian, embrio mampu menahan perendaman langsung dalam nitrogen cair (-196°C) tanpa pembentukan kristal es (Vajta et al., 1998).

Di sisi lain, konsentrasi cryoprotectant tinggi telah digambarkan sebagai mempromosikan toksisitas sel tinggi, bahkan jika terkena untuk periode singkat dan volume minimum dari solusi ini (Vajta et al., 1998). Dengan demikian, strategi yang berbeda telah dikembangkan untuk embrio agar memiliki kontak cepat dengan nitrogen cair dan untuk mengurangi volume agen cryoprotectant, seperti open pull straw (OPS; Vajta et al., 1998), cryoloop (Lane et al., 1999), microdroplets (Papis et al., 2000) dan teknik cryotop (Kuwayama et al., 2005).

Dalam protokol pembekuan lambat klasik, laju pendinginan dikontrol untuk mempertahankan kurva konstan sampai sedotan dengan embrio direndam dalam nitrogen cair. Penggunaan konsentrasi cryoprotectants yang rendah adalah keuntungan utama dari teknik ini karena konsentrasi tinggi bersifat racun bagi embrio. Selain itu, proses pencairan dan DT embrio ke sapi membuat protokol pembekuan lambat lebih efisien untuk penggunaan komersial.

Namun, kristal es dapat membentuk dan merusak struktur membran dan organel embrio (Dode et al., 2013). Dengan cara ini, keberhasilan pembekuan lambat dan transfer langsung embrio yang diproduksi secara in vitro selalu bergantung pada kesetimbangan antara laju dehidrasi sel dan laju perubahan air menjadi kristal es (Visintin et al., 2002).

Meskipun kemajuan dalam metode cryopreservation, proses pembekuan dan pencairan mengganggu kelangsungan hidup embrio. Kerusakan ini terjadi karena kerusakan fisik dan kimia yang diinduksi selama proses kriopreservasi (Overstrom, 1996; Baguisi et al., 2000). Sudano dkk. (2012a) melaporkan efek kerusakan ini dengan membandingkan tingkat apoptosis yang disebabkan oleh stres kriopreservasi antara blastokista segar dan vitrifikasi. Dalam penelitian ini, ada peningkatan 2,4 kali lipat ($P < 0,0001$) dalam tingkat apoptosis vitrifikasi ($49,4 \pm 1,9$) dalam kaitannya dengan embrio segar ($20,8 \pm 1,1$). Profil apoptosis serupa diamati dalam penelitian lain, yang menunjukkan peningkatan 3,7 kali lipat (Park et al., 2006) dan 1,7 kali lipat (Márquez-Alvarado et al., 2004) dalam tingkat apoptosis embrio cryopreserved dibandingkan dengan embrio segar.

Selain itu, telah terbukti secara definitif bahwa embrio in vitro lebih sensitif terhadap kriopreservasi dibandingkan embrio in vivo (Pollard dan Leibo, 1994). Cryotolerance yang lebih rendah ini telah dikaitkan dengan kandungan lipid yang tinggi di sitoplasma dari embrio ini (Abe et al., 2002; Mucci et al., 2006) dan penurunan kepadatan mitokondria matang dibandingkan dengan embrio yang diproduksi in vivo (Krosier et al., 2001; Farin et al., 2004). Selain itu, lipid yang paling melimpah dalam membran plasma sel (fosfatidilkolin dan sphingomyelin) juga memiliki profil yang berbeda (Sudano et al., 2012b).

Para peneliti berpendapat bahwa akumulasi lipid mungkin disebabkan oleh penyerapan medium kultur itu sendiri atau pada metabolisme yang tidak efisien dan tidak teratur dari mitokondria embrio (Farin et al., 2004);

Barceló-Fimbres dan Seidel, 2007a; Moore et al., 2007) . Lebih lanjut, embrio in vitro memiliki tingkat transkrip yang lebih sedikit untuk gen yang berkaitan dengan metabolisme lipid dibandingkan dengan embrio yang diproduksi in vivo (Gad et al., 2012). Oleh karena itu, penambahan zat untuk media kultur telah diusulkan selain menyesuaikan metode kriopreservasi untuk membuat embrio lebih cryotolerant (Dode et al., 2013).

Strategi untuk meningkatkan cryotolerance embrio in vitro

Meskipun banyak kemajuan dalam dekade terakhir, proses cryopreservation IVEP tetap menjadi tantangan utama pada ternak, dan hasilnya masih tidak konsisten (Sudano et al., 2013). Sebagai contoh, cryotolerance rendah embrio in vitro adalah kendala utama untuk penggunaan protokol cryopreservation (Sudano et al., 2011). Peran lipid embrio dalam hal ini dijelaskan dengan baik dalam literatur (Abe et al., 2002). Selanjutnya, strategi seperti penggunaan bebas serum media budaya, penambahan zat kimia untuk mempromosikan perubahan dalam metabolisme lipid, dan modulasi komposisi lipid membran dapat membantu meningkatkan kelangsungan hidup embrio in vitro setelah cryopreservation (Sudano et al., 2013).

Penyebab deposisi lipid sitoplasmatik pada embrio in vitro belum diketahui dengan baik, tetapi telah disarankan bahwa keberadaan serum dalam media kultur dapat langsung terlibat dalam proses ini (Sanches et al., 2013). Penelitian telah menunjukkan bahwa konsentrasi serum janin anak sapi (FCS) mempengaruhi jumlah tetapan lipid sitoplasma dari embrio (Leroy et al., 2005; Sudano et al., 2012a). Selain itu, embrio in vitro yang dikultur dalam medium bebas serum memiliki penurunan lipid dan cryotolerance yang lebih tinggi (Pereira dan Marques, 2008).

Alternatif untuk meningkatkan pembekuan embrio adalah penggunaan agen kimia lipolitik, seperti phenazine ethosulfate (PES), yang mengurangi akumulasi lipid dan mengatur metabolisme energetik oleh NADPH menjadi oksidasi NADP (De La Torre-Sanchez et al., 2006; Sudano et al., 2011). Menariknya, telah dilaporkan bahwa PES, ketika digunakan dalam periode pasca-pemadatan, mempromosikan peningkatan kelangsungan hidup pasca-kriopreservasi (Barceló-Fimbres dan Seidel, 2007b).

Dalam pengertian ini, sebuah studi yang melibatkan suplementasi dengan FCS dan PES menunjukkan peningkatan laju ekspansi ulang blastokel setelah proses vitrifikasi embrio ketika konsentrasi serum dikurangi menjadi 2,5% seiring dengan penambahan PES ke media kultur pada hari ke 4 (Tabel 1; Sudano et al., 2011).

Tabel 1. Pengaruh serum janin anak sapi (FCS) dan phenazine ethosulfate (PES) pada re-ekspansi blastocoele (berarti ± SEM).

Responses	Cryotolerance	
	Vitrified embryos (n)	Re-expansion rate (%)
FCS		
0%	233	90.5 ± 2.7 ^a
2.5%	346	81.6 ± 2.5 ^b
5%	332	78.0 ± 2.8 ^{bc}
10%	405	67.3 ± 3.5 ^c
<i>In vivo control</i>	15	93.3 ± 6.7 ^{aA}
PES		
Control	474	72.0 ± 3.0 ^B
PES day 2.5	362	79.9 ± 2.8 ^C
PES day 4.0	480	86.2 ± 2.4 ^{AC}

a-dDalam kolom, berarti tanpa superskrip umum berbeda (P <0,05). A-CDalam kolom, berarti tanpa superskrip umum berbeda (P <0,05). Diadaptasi dari Sudano dkk. (2011).

Penting untuk dicatat bahwa penambahan medium dengan 2,5% FCS tidak mengurangi cryotolerance embrio (diwakili oleh laju ekspansi ulang blastoke) dibandingkan dengan kelompok tanpa FCS. Namun, independen dari konsentrasi FCS dalam medium dan penggunaan PES, embrio dalam kelompok in vivo (kontrol) memiliki kelangsungan hidup tertinggi setelah vitrifikasi (Sudano et al., 2011).

Forskolin adalah agen kimia lipolitik lain yang digunakan untuk mengurangi kandungan lipid embrio in vitro. Agen ini bertindak langsung oleh aktivasi siklase adenilat, sehingga meningkatkan kadar cAMP dan merangsang lipolisis untuk mengaktifkan lipase (Men et al., 2006). Baru-baru ini, Paschoal et al. (2017) menunjukkan bahwa forskolin adalah agen lipolitik yang efektif bahkan pada konsentrasi rendah, menghasilkan pembentukan blastokista dengan jumlah sel yang lebih besar daripada kelompok yang tidak diobati. Selain itu, zat ini menurunkan embrio apoptosis yang disebabkan oleh metode kriopreservasi.

Oleh karena itu, telah dilaporkan sebelumnya bahwa pengobatan dengan forskolin sebelum vitrifikasi dengan Metode cryotop (batang polypropylene di mana embrio dialokasikan di samping volume minimum larutan cryoprotectant) meningkatkan cryotolerance dan tingkat kehamilan *Bos indicus* embrio in vitro setelah transfer ke penerima (Sanches et al., 2013). Hasilnya ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Tingkat kehamilan *Bos indicus* embrio in vitro diobati dengan atau tanpa forskolin agen lipolitik selama 48 jam dalam kultur sebelum proses vitrifikasi.

Treatment	Transferred embryos (n)	Pregnancy rate (%)
Control	65	18.5 ^b
Forskolin	80	48.8 ^a

a, bDalam kolom, tarif tanpa superskrip umum berbeda ($P < 0,05$). Diadaptasi dari Sanches et al. (2013).

Menurut hasil ini, penggunaan forskolin dan vitrifikasi dengan sistem cryotop sebagai sistem kriopreservasi strategis bisa menjadi alternatif yang hebat untuk memfasilitasi transportasi dan ekspor embrio jarak jauh (Sanches et al., 2013).

Selain itu, tahap pengembangan blastokista pada saat mereka menjalani kriopreservasi adalah faktor lain yang perlu dipertimbangkan sebagai strategi untuk meningkatkan cryotolerance. Misalnya, Kocyigit dan Cevik (2016), menunjukkan korelasi antara diameter embrio dan cryosurvival mereka, di mana blastokista awal dan diperluas lebih sensitif terhadap kerusakan yang dipromosikan oleh vitrifikasi dan pemanasan posterior dibandingkan dengan tahap blastokista. Dalam pengalaman kami, tahap perkembangan yang ideal adalah blastokista dan perluasan blastokista untuk kedua metode vitrifikasi dan transfer langsung.

Pembekuan lambat embrio untuk kemudian DT, meskipun memiliki biaya yang lebih tinggi, menghilangkan evaluasi sebelum transfer, yang membuatnya lebih praktis daripada vitrifikasi. Selain itu, konsentrasi cryoprotectants yang lebih kecil juga dapat digunakan, sehingga mengurangi toksisitas pada embrio (Voelkel dan Hu, 1992).

Singkatnya, dalam metode DT, embrio in vitro dikriopreservasi oleh metode pembekuan lambat yang dijelaskan sebelumnya untuk embrio in vivo (Vajta et al., 1998). Embrio in vitro selanjutnya terkena larutan pembekuan yang terdiri dari 1,5 M etilen glikol (EG), dan pada akhir kurva pembekuan, embrio langsung direndam dalam nitrogen cair dan disimpan sampai ditransfer ke penerima.

Anehnya, strategi ini telah ditunjukkan untuk membantu mengatasi hambatan dalam kriopreservasi embrio in vitro. Pada Tabel 3 tingkat kehamilan untuk segar, vitrifikasi, dan beku (transfer langsung) embrio in vitro dari sapi perah disajikan.

Tabel 3. Tingkat kehamilan pada 30 hari setelah transfer fresh, vitrified atau frozen (direct transfer) embrio yang diproduksi secara in vitro setelah pengambilan ovum sapi-sapi Girolando.

Group	Transferred embryos (n)	Pregnancy (%)
Fresh	259	43.24 ± 1.23 ^a
Vitrified	234	31.19 ± 4.01 ^b
Frozen	311	34.72 ± 4.15 ^b

a, b Huruf yang berbeda dalam kolom yang sama menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P < 0,05$). Diadaptasi dari Sanches et al. (2016).

Hasil penelitian ini mengungkapkan kemungkinan menggunakan embrio beku karena transfer langsung mengoptimalkan logistik dan dapat menjadi pendekatan yang lebih praktis untuk transfer cryopreserved embrio in vitro di lapangan (Sanches et al., 2016).

Protokol transfer langsung telah digunakan dalam operasi berskala besar, terutama di AS dan Brasil. Dalam waktu dekat, setelah perusahaan lain menggabungkan protokol transfer langsung dalam operasi mereka, mayoritas embrio IVEP komersial mungkin akan dibekukan, seperti yang saat ini terjadi dalam industri semen.

Meskipun ada kemajuan dalam metode cryopreservation, beberapa pemain menggunakan teknik ini, dan beberapa tantangan tetap berhubungan dengan efisiensi teknik yang lebih besar.

Pentingnya seleksi sapi penerima

Pilihan penerima merupakan bagian penting dari keberhasilan program ET sapi, karena banyak masalah dengan aplikasi bioteknologi ini terkait

dengan kondisi perempuan yang akan memungkinkan implantasi embrio dan pemeliharaan kehamilan sampai janin lahir (Andrade et al., 2012).

Di antara faktor-faktor yang secara langsung mengganggu kinerja embrio ditransfer segar atau cryopreserved, aspek utama yang disorot adalah usia penerima, kondisi sanitasi dan gizi penerima, dan tingkat sinkron antara tahap embrio dan penerima (Sreenan dan Diskin, 1987; Hasler et al., 1987; Callesen et al., 1996; Peixoto et al., 2004, Jones and Lamb, 2008).

Sebuah studi yang menarik mengevaluasi efek sinkron antara tahap embrio dan penerima pada pemanjangan dan tingkat kehamilan konseptus. Dalam penelitian ini, penulis menunjukkan bahwa panjang konsepsi lebih besar setelah transfer ke uterus lanjut dan suplementasi dengan progesteron menghasilkan siklus pendek pada sekitar 50% penerima. Transfer embrio hari ke-7 ke uterus sinkron (hari ke 7) menghasilkan tingkat kehamilan 47,3%. Transfer ke uterus asynchronous hari ke 5 (40,8%) atau hari 8 embrio (41,3%) cukup berdampak pada tingkat kehamilan ($P < 0,01$), tetapi transfer ke uterus 2 hari sebelumnya (hari ke 9, 24,4%) atau 3 hari di belakang (hari ke 4, 27,0%) berkurang ($P < 0,001$) tingkat kehamilan dibandingkan dengan transfer sinkron (Randi et al., 2015). Menariknya, penelitian ini menekankan pentingnya kemungkinan sinkronisasi yang lebih besar antara tahap embrio dan hari siklus penerima.

Selain itu, teknologi baru telah dikembangkan dengan tujuan membantu pemilihan penerima menjadi lebih akurat dengan mencari penanda genetik yang terkait dengan karakteristik yang diinginkan. Urutan genom sapi memungkinkan studi asosiasi genom-lebar (GWAS) untuk dilakukan, yang memeriksa situs tertentu, seperti polimorfisme nukleotida tunggal (SNPs), dan mengasosiasikannya dengan fenotip tertentu (Dairy Herd Management, 2017).

Baru-baru ini, adalah mungkin untuk menggunakan program komersial yang ditujukan untuk identifikasi lokus genomik yang terkait dengan kesuburan pada sapi dan sapi perah. Beberapa gen spesifik yang terkait dengan kelainan janin yang mengarah pada aborsi, kematian embrionik, atau kesuburan rendah, serta gen yang terkait dengan efisiensi reproduksi yang lebih baik, telah diidentifikasi.

Oleh karena itu, informasi ini terkait dengan metode dan kriteria lain untuk memilih penerima dapat membantu optimalisasi dan keberhasilan praktis ET dan akibatnya dapat meningkatkan efisiensi IVEP di lapangan.

Batasan komersial dan operasional untuk kriopreservasi embrio yang diproduksi secara in vitro.embrio

Kriopreservasi sapi adalah bioteknologi yang memungkinkan penyimpanan embrio surplus yang dihasilkan secara in vitro atau melalui program superovulasi / embrio transfer, membuat komersialisasi yang layak antara negara dan transfer embrio pada lebih banyak waktu yang nyaman (Sudano et al., 2012b).

Namun, jumlah embrio cryopreservasi dalam beberapa tahun terakhir hanya mewakili 3 hingga 7% dari total produksi embrio di Brasil (Stroud, 2011, 2012; Viana, 2012). Data ini mencerminkan tantangan besar untuk penerapan teknik ini.

Seperti yang telah dibahas sebelumnya, cryotolerance rendah embrio in vitro merupakan hambatan yang sangat penting untuk penggunaan proses kriopreservasi dalam program IVEP (Sudano et al., 2011). Dalam konteks ini, banyak upaya telah dilakukan oleh kelompok penelitian yang berbeda untuk meningkatkan kondisi medium kultur selama IVEP atau untuk mengubah protokol cryopreservation (Sudano et al., 2013). Penting juga untuk menekankan bahwa kapasitas bertahan hidup embrio setelah kriopreservasi adalah kejadian multifaktorial (Sudano et al., 2013).

Kelangsungan hidup embrio setelah pembekuan / pencairan dipengaruhi oleh aspek penting, seperti komposisi media kultur (aditif, suplementasi dengan atau tanpa serum janin anak sapi, pH, dan osmolaritas), kualitas oosit dan semen, dan teknisi yang menghasilkan embrio di laboratorium (Gardner, 2008; Feugang et al., 2009; Hasler, 2010). Fitur lain yang harus dipertimbangkan adalah atmosfer (ketegangan oksigen yang lebih rendah atau lebih tinggi) di mana embrio tumbuh, yang memiliki telah banyak digunakan untuk meminimalkan stres oksidatif; tekanan oksigen rendah meningkatkan metabolisme dan mengurangi produksi radikal bebas (Dode et al., 2013).

Akhirnya, kualifikasi dokter hewan lapangan / teknis yang bertanggung jawab untuk melakukan transfer embrio ke rahim penerima adalah faktor lain yang membatasi penggunaan embrio cryopreserved dalam program ET. Secara umum, profesional harus melakukan proses dengan cara yang hati-hati, cepat dan akurat.

Dalam pengalaman kami, posisi pekerjaan ini (transfer embrio) akan menjadi batasan berikutnya untuk menggunakan kriopreservasi IVEP dalam skala besar dan global. Setelah teknologi terbukti dan diterima dengan baik, tidak akan ada sejumlah teknisi lapangan yang dapat melakukan transfer embrio.

Oleh karena itu, faktor-faktor ini, ketika dipertimbangkan bersama, akan secara langsung mencerminkan tingkat kehamilan dan mungkin memiliki dampak positif pada aplikasi skala besar IVEP dan kriopreservasi embrio pada sapi.

Komentar akhir

Dalam dekade terakhir, beberapa kemajuan teknis telah meningkatkan efisiensi IVEP, membuat strategi reproduksi ini memiliki dampak yang lebih besar pada seleksi dan diseminasi genetik pada ternak. Di sisi lain, kebutuhan untuk metode yang efisien untuk cryopreserve volume surplus dari program embrio telah dihasilkan. Untuk embrio in vitro, vitrifikasi telah menjadi teknik yang paling sering digunakan untuk kriopreservasi di seluruh dunia, yang telah berkontribusi secara luas untuk penyimpanan embrio, serta membuat program IVEP lebih efisien.

Oleh karena itu, pelaksanaan program komersial untuk IVEP dan kriopreservasi perlu mengatasi banyak tantangan ketika menggunakan protokol vitrifikasi. Tidak ada pertanyaan bahwa kita harus mengembangkan dan meningkatkan efisiensi teknik transfer langsung untuk membuat teknologi IVEP dapat diakses oleh semua orang di mana-mana. Seiring dengan pemilihan penerima sesuai dengan status sanitasi dan gizi yang baik, sinkroni yang memadai antara tahap embrio dan siklus penerima, kemampuan ibu yang tinggi, dan pilihan perempuan dengan karakteristik terkait dengan kesuburan merupakan aspek mendasar bagi keberhasilan bioteknologi ini. Akhirnya, seluruh proses in vitro untuk produksi atau kriopreservasi membutuhkan tim yang sangat berkualitas dan terlatih untuk melakukan setiap langkah dari perjalanan ini.

Referensi

- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. 2002. Akumulasi tetesan lipid sitoplasma pada embrio sapi dan cryotolerance embrio yang dikembangkan dalam sistem budaya yang berbeda menggunakan media yang mengandung serum atau yang mengandung serum. *Mol Reprod*, 61: 57-66.
- Andrade GA, Fernandes MA, Knychala RM, MV Pereira Junior, Oliveira AJ, Nunes DP, Bonato G, Santos RM. 2012. Fatores que afetam suatu taksa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. *Rev Bras Reprod Anim*, 36: 66-69.
- Baguisi A, Lonergan P, Overstrom E, Boland M. 2000. Vitrifikasi embrio bovine: insidensi nekrosis dan apoptosis. *Theriogenology*, 55: 162.
- Abstract. Barceló-Fimbres M, Seidel GEJ. 2007a. Efek baik glukosa atau fruktosa dan regulator metabolik pada perkembangan embrio sapi dan akumulasi lipid in vitro. *Mol Reprod Dev*, 74: 1406-1418.
- Barceló-Fimbres M, Seidel GEJ. 2007b. Efek serum janin anak lembu, phenazine ethosulfate dan glukosa atau fruktosa selama kultur in vitro embrio sapi pada perkembangan embrio setelah kriopreservasi. *Mol Reprod Dev*, 74: 1395-1405.
- Callesen H, Liboriussen T, Greve T. 1996. Aspek praktis dari transfer ovulasi-embrio multipel pada sapi. *Anim Reprod Sci*, 42: 205-214.
- Chebel RC, Demétrio DGB, Metzger J. 2008. Faktor yang mempengaruhi keberhasilan pengumpulan embrio dan transfer pada kawanan sapi perah besar. *Theriogenology*, 69: 98-106.
- Krosier AE, Farin PW, Dykstra MJ, Alexander JE, Farin CE. 2001. Morfometri ultrastruktural blastokista sapi diproduksi in vivo atau in vitro. *Biol Reprod*, 64: 1375-1385.
- Dairy Herd Management [homepage di Internet]. 2017. Genomik kesuburan dan sifat kesehatan. Tersedia di: <http://www.dairyherd.com/advice-andtips/reproduction/genomics-fertility-and-health-traits>. Diakses pada: 10 April. 2017.
- De La Torre-Sanchez JF, Gardner DK, Preis K, Gibbons J, GE Seidel. 2006. Pengaturan metabolisme embrio sapi buatan in vitro. II. Efek dari phenazine ethosulfate, sodium azide dan 2,4-dinitrophenol selama perkembangan pasca-pemadatan pada metabolisme glukosa dan akumulasi lipid. *Reprod Fertil Dev*, 18: 597-607.
- Dode MAN, Leme LO, Spricigo JFW. 2013. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. *Rev Bras Reprod Anim*, 37: 145-150.
- Farin CE, Farin PW, Piedrahita JA. 2004. Perkembangan janin dari embrio sapi yang diproduksi secara in vitro dan dikloning. *J Anim Sci*, 82 (E-suppl): 53-62.
- Ferreira G. 2013. Kinerja reproduksi peternakan sapi perah di provinsi Buenos Aires barat, Argentina. *J Dairy Sci*, 96: 8075-8080.
- Feugang JM, Camargo-Rodriguez O, Memili E. 2009. Sistem budaya untuk embrio sapi. *Livest Sci*, 121: 141-149.
- Gad A, Hoelker M, Besenfelder U, Havlicek V, Cinar U, Rings F, Held E, Dufort I, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. 2012. Mekanisme molekuler dan jalur yang terlibat dalam aktivasi genom embrio bovin dan pengaturannya dengan alternatif in vivo dan kondisi kultur in vitro. *Biol Reprod*, 87: 100. doi: 10.1095/biolreprod.112.099697.
- Gardner DK. 2008. Diseksi media kultur untuk embrio: komponen dan karakteristik yang paling penting dan kurang penting. *Reprod Fertil Dev*, 20: 9-18.
- Hasler JF, Mccauley AD, Lathrop WF, Foote RH. 1987. Pengaruh interaksi donor-embrio-penerima pada tingkat kehamilan dalam program transfer embrio bovine skala besar. *Theriogenology*, 27: 139-168.
- Hasler JF. 2010. Media sintesis untuk biakan, pembekuan dan vitrifikasi embrio sapi. *Reprod Fertil Dev*, 22: 119-125.
- Jones AL, Lamb GC. 2008. Nutrisi, sinkronisasi, dan pengelolaan penerima transfer embrio sapi. *Theriogenology*, 69: 107-115.
- Kocyyigit A, Cevik M. 2016. Korelasi antara cryosurvival, jumlah sel dan diameter pada embrio yang diproduksi in vitro sapi. *Cryobiology*, 73: 203-208.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP. 2005. Metode vitrifikasi yang sangat efisien untuk kriopreservasi oosit manusia. *Reprod Biomed*, 11: 300-308.
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. 1999. Vitrifikasi mouse dan blastokista manusia menggunakan teknik cryoloop container-less baru. *Fertil Steril*, 72: 1073-1078.
- Leroy JL, Opsomer G, De Vlieghe S, T Pengganti, Goossens L, Geldhof A, Bols PE, DE Kruif A, Van Soom A. 2005. Perbandingan kualitas embrio pada sapi perah kelas tinggi, di dara sapi dan sapi sapi. *Theriogenology*, 64: 2022-2036.
- Marinho LSR, Untura RM, Morotti F, Moino LL, Rigo AG, Sanches BV, Pontes JHF, Seneda MM. 2012. Program berskala besar untuk penerima embrio yang diproduksi secara in vitro produktif. *Anim Reprod*, 9: 323-328.
- Marinho LSR, Sanches BV, Rosa CO, Tannura JH, Rigo AG, Basso AC, Pontes JHF, Seneda MM. 2015. Tingkat kehamilan untuk transfer embrio permanen IVP Bos indicus, Bos Taurus atau Bos indicus x Bos taurus embrio. *Reprod Domest Anim*, 50: 807-811.
- Márquez-Alvarado YC, Galina CS, Castilla B, León H, Moreno-Mendoza N. 2004. Bukti kerusakan pada cryopreserved dan embrio sapi segar menggunakan teknik TUNEL. *Reprod Domest Anim*, 39: 141-145.
- McKeegan PJ, Sturmey RG. 2012. Peran asam lemak dalam oosit dan perkembangan embrio awal. *Reprod Fertil Dev*, 24: 59-67.
- Pria H, Agca Y, Riley LK, Critser JK. 2006. Peningkatan kelangsungan hidup embrio babi vitrifikasi setelah delipasi parsial melalui lipolisis yang distimulasi secara kimia dan penghambatan apoptosis. *Theriogenology*, 66: 2008-2016.
- Moore K, Rodriguez-Sallaberry CJ, Kramer JM, Johnson S, Wroclawska, E, Goicoa S, Niasari-Naslaji A. 2007. Produksi in vitro embrio sapi dalam medium yang dilengkapi dengan pengganti serum: efek pada pengembangan blastokista, cryotolerance dan kelangsungan hidup untuk istilah. *Theriogenology*, 68: 1316-1325.
- Morotti F, Sanches BV, Pontes JHF, Basso AC, Siqueira ER, Lisboa LA, Seneda MM. 2014.

Tingkat kehamilan dan tingkat kelahiran anak sapi dari program IVF berskala besar menggunakan air mani yang diurutkan terbalik di *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, dan sapi *Bos taurus*. *Theriogenology*, 81: 696-701. Mucci N, Aller J, Kaiser GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. 2006. Pengaruh serum sapi estrus selama kultur embrio sapi pada perkembangan blastokista dan cryotolerance setelah pembekuan lambat atau vitrifikasi. *Theriogenology*, 65: 1551-1562. Overstrom EW. 1996. Penilaian in vitro viabilitas embrio. *Theriogenology*, 45: 3-16. Papis K, Shimizu M, Izaïke Y. 2000. Faktor-faktor yang mempengaruhi kelangsungan hidup oosit sapi yang membara di tetesan. *Theriogenology*, 54: 651-658.

Park SY, Kim EY, Cui XS, Tae JC, Lee WD, Kim NH, Park SP, Lim JH. 2006. Peningkatan fragmentasi DNA dan ekspresi gen terkait apoptosis pada blastokista bovin beku-beku. *Zygote*, 14: 125-131. Paschoal DM, Sudano MJ, Schwarz KRL, Maziero RRD, Guastali MD, Crocomo LF, Magalhães LCO, Martins Jr, A, Leal ALV, Landim-Alvarenga FC. 2017. Apoptosis sel dan konten lipid dari embrio yang dihasilkan secara in vitro, embrio sapi yang diberi vitrifikasi yang diterapi dengan forskolin. *Theriogenology*, 87: 108-114. Peixoto MGCD, Bergmann JAG, Alvim MTT, Penna VM. 2004. Fatores que influenciaram suatu prenhez de embriões zebuínos em receptoras mestiças. Dalam: Abstrak dari V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Hewan, 2004, Pirassununga, SP. Pirassununga, SP: SBMA. 4 pp. Pereira RM, Marques CC. 2008. Oosit hewan dan kriopreservasi embrio. *Cell Tissue Bank*, 9: 267-277. Perry G. 2016. IETS 2016. 2015 Statistik pengumpulan embrio dan transfer pada hewan ternak domestik. *Newsletter Teknologi Embryo*, 34: 1-75. Pollard JW, Leibo SP. 1994. Sensitifitas penderiahan embrio mamalia. *Theriogenology*, 41: 101-106. Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches, BV, Porcionato, JPF, Vieira, PHS, Faifer, FS, Sterza, FAM, Schenk, JL, Seneda, MM. 2010. Produksi embrio in vitro skala besar dan tingkat kehamilan dari *Bos taurus*, *Bos indicus*, dan sapi perah *indicus-taurus* menggunakan sperma yang dikuliti. *Theriogenology*, 74: 1349-1355. Pontes JHF, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KC, Seneda MM. 2011. Ovum mengambil, produksi embrio in vitro, dan tingkat kehamilan dari program komersial berskala besar menggunakan donor sapi Nelore (*Bos indicus*). *Theriogenology*, 75: 1640-1646. Pryor JH, Trant JA, Ponchiroli-Schneider CB, Looney CR, CR Panjang, Forrest DW. 2009. Penggunaan forskolin dan pengaruhnya pada embrio yang diproduksi secara in-vitro diserahkan untuk memperlambat pembekuan atau vitrifikasi yang dingin. *Reprod Fertil Dev*, 22: 214-214. Randi F, Fernandez-Fuertes B, McDonald M, Forde N, Kelly AK, Amarin HB, Lima EM, Morotti F, Seneda MM, Lonergan P. 2015. Asynchronous embryo transfer sebagai alat untuk memahami interaksi embrio-uterus pada sapi: adalah konsep besar adalah hal yang baik? *Reprod Fertil Dev*, 28: 1999-2006.

Sanches BV, Marinho LSR, Filho BDO, Pontes JHF, Basso AC, Meirinhos, MLG, Silva-Santos KC, Ferreira CR, Seneda MM. 2013. Kriopreservasi dan tingkat kehamilan setelah paparan embrio *Bos indicus* IVF yang diturunkan ke forskolin sebelum vitrifikasi. *Theriogenology*, 80: 372-377. Sanches BV, Lunardelli PA, Tannura JH, Cardoso BL, Pereira MHC, Gaitkoski G, Basso AC, Arnold DR, Seneda MM. 2016. Protokol transfer langsung baru untuk embrio IVF cryopreserved. *Theriogenology*, 85: 1147-1151. Saragusty J, Arav A. 2011. Kemajuan saat ini dalam kriopreservasi oosit dan embrio dengan pembekuan lambat dan vitrifikasi. *Reproduksi*, 141: 1-19. Segerson EC, Hansen TR, Libby DW, Randel RD, Getz WR. 1984. Morfologi dan fungsi ovarium dan uterus pada sapi Angus dan Brahman. *J Anim Sci*, 59: 1026-1046. Silva-Santos KC, Santos GMG, LS Siloto, Hertel MF, Andrade ER, Rubin MIB, Sturion L, MeloSterza FA, Seneda MM. 2011. Perkiraan populasi folikel preantral di ovarium *Bos taurus indicus* dan *Bos taurus taurus* ternak. *Theriogenology*, 76: 1051-1057. Sreenan JM, Diskin MG. 1987. Faktor yang mempengaruhi tingkat kehamilan setelah transfer embrio pada sapi. *Theriogenology*, 27: 99-113. Stewart BM, Blok J, Morelli P, Navarette AE, Amstalden M, Bonilla L, Hansen PJ, Bilby TR. 2011. Kemanjuran transfer embrio pada sapi perah laktasi selama musim panas menggunakan embrio segar atau vitrifikasi yang diproduksi in vitro dengan semen yang diurutkan berdasarkan jenis kelamin. *J Dairy Sci*, 94: 3437-3445. Stroud B. 2011. IETS 2011 Statistik dan laporan pengambilan data komite: tahun 2010 di seluruh dunia statistik transfer embrio pada hewan ternak domestik. *Embryo Trans Newslett*, 29: 14-23. Stroud B. 2012. IETS 2012 statistik dan laporan pengambilan data komite: statistik dunia tahun 2011 dari transfer embrio pada hewan ternak domestik. *Embryo Trans Newslett*, 30: 16-26. Sudano MJ, Paschoal DM, Rascado TD, Magalhaes LCO, Crocomo LF, Lima-Neto JF, LandimAlvarenga FD. 2011. Kandungan lipid dan apoptosis embrio bovine yang diproduksi secara in vitro sebagai penentu kerentanan terhadap vitrifikasi. *Theriogenology*, 75: 1211-1220. Sudano MJ, Santos VG, Tata A, Ferreira CR, Paschoal DM, Machado R, Buratini J, Eberlin MN, Landim-Alvarenga FDC. 2012b. Profil Phosphatidylcholine dan sphingomyelin bervariasi dalam *Bos taurus indicus* dan *Bos taurus taurus* in vitro dan blastokista in vivo. *Biol Reprod*, 87: 1-11. doi: 10.1095 / biolreprod.112.102897. Sudano MJ, Paschoal DM, Maziero RRD, TS Rascado, MD Guastali, Crocomo LF, Magalhães LCO, Monteiro BA, Martins Jr A, Machado R, LandimAlvarenga FDC. 2013. Meningkatkan kapasitas bertahan hidup pasca-kriopreservasi: pendekatan yang berfokus pada embrio. *Anim. Reprod*, 10: 160-167. Sudano MJ, Paschoal DM, TS Rascado, Crocomo LF, LC Magalhaes, Junior AM, Machado

R, Landim-Alvarenga FC. 2012a. Aspek penting yang masih hidup untuk embrio bovine yang diproduksi secara in vitro. *Zygote*, 22: 124-131.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. 1998. Vitrifikasi terbuka menarik jerami (OPS): cara baru untuk mengurangi cryoinjuries dari ovum dan embrio sapi. *Mol Reprod Dev*, 51: 53-58.

Vajta G, Kuwayama M. 2006. Meningkatkan sistem kriopreservasi. *Theriogenology*, 65: 236-244. Viana JHM. 2012. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *O Embrião*, 51: 6-10. Visintin JA, Martins JFP, Bevilacqua EM, Mello MRB, Nicácio AC, Assumpção MEOA. 2002. Kriopreservasi *Bos taurus* vs *Bos indicus* embrio: apakah mereka benar-benar berbeda? *Theriogenology*, 57: 345-359. Voelkel SA, Hu YX. 1992. Pengalihan langsung embrio bovin frozenthawed. *Theriogenology*, 37: 23-37.

Industri embrio Brasil dalam konteks: Tantangan, pelajaran, dan harapan untuk masa depan

João Henrique Moreira Viana^{1,4}, Ana Cristina Silva Figueiredo², Luiz Gustavo Bruno Siqueira³

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil. ²Universidade Jose do Rosario Vellano, Alfenas, MG, Brasil. ³Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Abstrak

Tujuan dari tinjauan ini adalah untuk memberikan gambaran singkat tentang situasi industri embrio saat ini di Brasil, dalam konteks skenario produksi ternak nasional dan internasional. Jumlah total embrio yang dihasilkan (375,894) menurun pada tahun 2015 dibandingkan dengan tahun-tahun sebelumnya. B. taurus breed sapi perah dan persilangan adalah 51,8% dari total produksi embrio. Selain itu, persentase embrio beku-tawed yang ditransfer mencapai 22,8% pada tahun 2015, nilai tertinggi dalam satu dekade. Proporsi embrio yang lebih besar diproduksi secara in vitro, baik pada susu (97,2%) dan daging sapi (90,2%). Penggunaan teknologi embrio di Brasil telah sangat meningkat 726,5% dalam 20 tahun terakhir, tetapi masih mewakili hanya 0,33% dari jumlah sapi dan sapi di usia reproduksi. Meskipun demikian, embrio transfer (ET) menyumbang sekitar 19,7% dari semua anak sapi ras yang lahir dan terdaftar oleh Asosiasi Peternak Sapi Zebu Brasil pada periode 2005-2015, menyoroti pentingnya ET untuk pembibitan hewan dan perbaikan genetik kawanan. Dalam konteks dunia, Brasil adalah produsen terbesar embrio yang diproduksi secara in vitro (IVP), tetapi hanya menempati peringkat ke-11 berdasarkan indeks intensitas penggunaan teknologi embrio, di bawah Kanada, AS, dan berbagai negara Eropa. Skenario ini menunjukkan potensi peningkatan lebih lanjut dalam produksi embrio di Brasil, terutama terkait dengan adopsi teknologi baru yang diharapkan oleh sebagian besar peternakan sapi perah dan sapi; penggunaan teknologi embrio untuk produksi silang skala besar; dan pada akhirnya peningkatan aktivitas impor / ekspor embrio internasional.

Kata kunci: produksi ternak, teknologi embrio, statistik.

Pendahuluan

Industri embrio Brasil mengalami perubahan luar biasa dalam 15 tahun terakhir, sebagian besar terkait dengan penerapan teknologi in vitro. Pada sapi, ada > 5 kali lipat peningkatan produksi embrio, dan fertilisasi / kultur in vitro hampir sepenuhnya menggantikan superovulasi (MOET) sebagai teknik pilihan untuk produksi embrio. Pengembangan IVP di Brasil telah dibahas dalam studi sebelumnya (Viana et al., 2010, 2012; Sartori et al., 2016), dengan fokus utama pada aspek teknis teknologi. Penggunaan

transfer embrio, bagaimanapun, mempengaruhi produksi ternak secara keseluruhan baik dengan meningkatkan kemajuan genetik program pemuliaan hewan dan dengan menyediakan metode alternatif baru untuk menghasilkan hewan yang disilangkan.

Namun demikian, perubahan dalam sistem produksi susu dan daging sapi, yang disebabkan oleh tekanan untuk meningkatkan produktivitas, mengurangi biaya, atau meningkatkan kesejahteraan hewan mungkin akan mendorong tuntutan lebih lanjut untuk pengembangan teknologi embrio. Jadi, untuk memahami kontribusi masa lalu dan harapan prospektif industri embrio Brasil, catatan dan angka harus dianalisis dalam konteks. Dalam studi ini kami menyajikan deskripsi singkat tentang situasi saat ini produksi embrio di Brasil, serta beberapa indeks yang diusulkan untuk mengkarakterisasi kegiatan yang terkait dengan teknologi embrio dalam skenario nasional dan internasional.

⁴Pengarang yang sesuai: henrique.viana@embrapa.br Telepon: +55 (61) 3448-4693 Diterima: 22 Mei 2017
Diterima: 12 Juni 2017

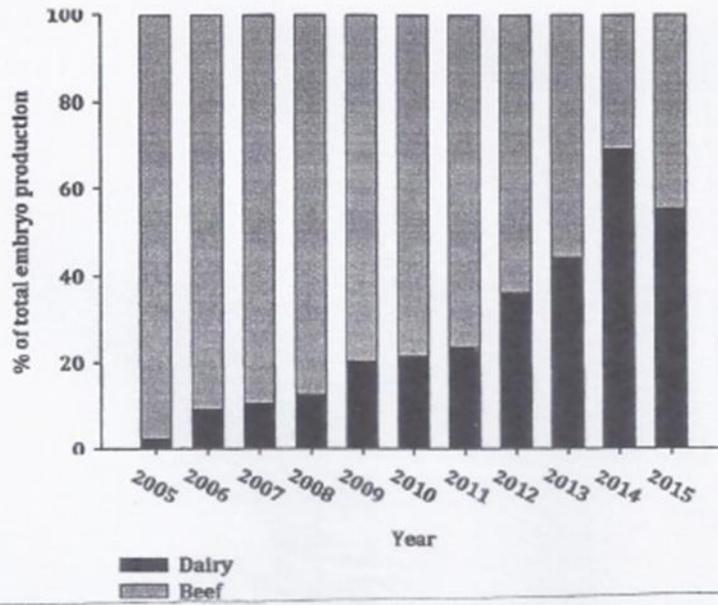
Ringkasan perubahan dalam industri embrio Brasil selama dekade terakhir

Data produksi embrio Brasil pada tahun 2015, didiskriminasikan oleh kelompok genetik (*Bos taurus* dan *Bos indicus*), industri (susu dan daging sapi) dan teknologi yang digunakan (*in vivo derived* - IVD atau dalam vitro yang dihasilkan - IVP) ditunjukkan pada Tabel 1. Penurunan jumlah embrio yang dihasilkan diamati relatif terhadap tahun sebelumnya (375,894 pada tahun 2015 vs 391.805 pada tahun 2014; -4,1%), serupa dengan apa yang telah diamati sejak 2013, yang mungkin terkait dengan resesi ekonomi Brasil selama periode ini. Retraksi dalam aktivitas industri embrio ini menghentikan tren pertumbuhan jumlah Brasil yang diamati selama dekade terakhir, terutama ditentukan oleh peningkatan signifikan dalam penggunaan produksi embrio *in vitro* (IVEP) pada breed susu (Gambar 1).

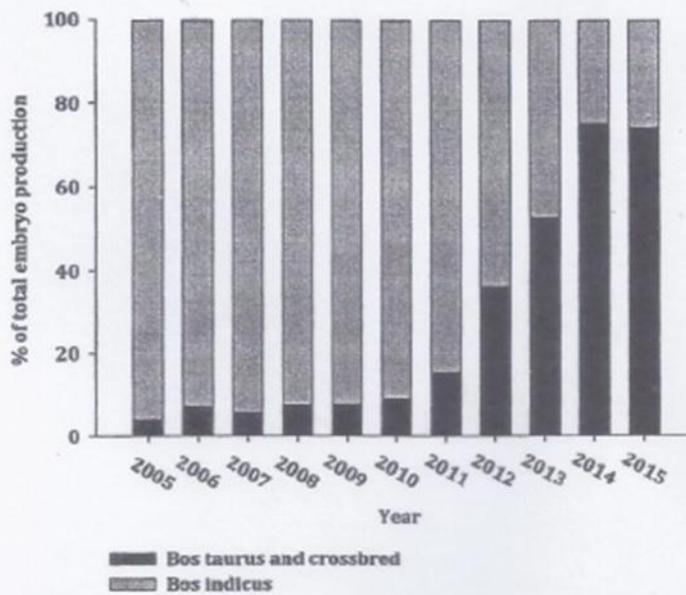
Peningkatan IVEP perah terutama didukung oleh ketersediaan komersial dari semen yang diurutkan berdasarkan jenis kelamin (Pontes et al., 2010) dan menyebabkan perubahan penting dalam fitur pasar embrio Brasil. Yang paling signifikan adalah pergeseran ke arah penggunaan breed *B. taurus* untuk IVEP (Gbr. 2). Pada tahun 2005, breed sapi zebu (kebanyakan Nelore) menyumbang 93,8% dari semua embrio yang dihasilkan, sedangkan breed sapi *B. taurus* dan persilangan menjadi pasar paling penting untuk industri embrio pada tahun 2015, sesuai dengan 51,8% dari total jumlah embrio. Mayoritas embrio masih dipindahkan segar, tetapi persentase embrio beku-thawed telah tumbuh dalam beberapa tahun terakhir, mencapai 22,8% pada tahun 2015, tertinggi dalam satu dekade, kemungkinan karena perbaikan dalam strategi kriopreservasi, seperti transfer langsung (Sartori et al., 2016). Data dari 2005-2015 juga menunjukkan bahwa tidak ada perubahan dalam penggunaan fertilisasi / kultur *in vitro* sebagai teknik pilihan untuk produksi embrio, baik pada susu (97,2%) dan sapi (90,2%) breed.

Tabel 1. Produksi embrio sapi di Brasil pada tahun 2015, menurut kelompok genetik (*Bos taurus* atau *Bos indicus*), industri (susu atau daging sapi), dan teknologi yang digunakan (*in vivo derived* - IVD atau *in vitro* yang diproduksi - IVP).

Group	IVD	IVP
<i>B. indicus</i> dairy	172	13,481
<i>B. taurus</i> dairy	5,759	188,853
Subtotal dairy	5,931	202,334
<i>B. indicus</i> beef	2,042	81,636
<i>B. taurus</i> beef	14,382	69,569
Subtotal beef	16,424	151,205
Total	22,355	353,539



Gambar 1. Persentase produksi embrio total Brasil dari sapi perah dan daging sapi, dari 2005 hingga 2015.



Gambar 2. Persentase produksi embrio total Brasil dari B. taurus dan B. indicus breeds, dari 2005 hingga 2015

Relevansiteknologi embrio

Keberhasilan IVEP komersial memulai pertumbuhan eksponensial dalam produksi embrio Brasil dan, sejak 2010, negara melaporkan > 300.000 embrio per tahun. Terlepas dari banyaknya studi yang mengevaluasi aspek ekonomi IVEP di Brasil, jumlah embrio yang dihasilkan tidak diragukan lagi menggambarkan dampak adopsi teknologi in vitro untuk industri embrio. Demikian juga, pertumbuhan IVEP dikaitkan dengan perkembangan paralel dari rantai pemasok jasa hewan, hormon, media, sekali pakai, peralatan, penerima, antara lain. Menariknya, jika produksi embrio dianalisis dalam menghadapi ukuran kawanan sapi Brasil, jelas Paradoks terbukti. Tabel 2 menunjukkan evolusi populasi ternak populasi pada periode 1995-2015 dan perkiraan penggunaan relatif iseminasi buatan (AI) dan transfer embrio (ET). Proyeksi ini menunjukkan bahwa penggunaan teknologi embrio meningkat dengan tingkat yang luar biasa sebesar 726,5% dalam 20 tahun terakhir; Namun, teknologi ini masih hanya mencapai 0,33% dari sapi dan sapi yang cocok untuk reproduksi, proporsi yang sangat rendah bahkan mengingat rendahnya penggunaan teknologi reproduksi lainnya seperti AI (13,3%). Pada breed sapi perah, peningkatan penggunaan ET bahkan lebih besar (2,261,7%), tetapi penggunaan relatif juga sangat terbatas (0,48%). Oleh karena itu, kami mengajukan pertanyaan: seberapa relevan teknologi embrio untuk produksi ternak Brasil

Tabel 2. Perkiraan penggunaan inseminasi buatan (AI) dan transfer embrio (ET) sebagai persentase dari kawanan sapi Brasil, 1995-2015.

	1995	2000	2005	2010	2015
Herd size ¹	161,227,938	169,875,524	207,156,696	209,541,109	215,199,488
Heifers and cows ²	42,886,632	45,186,889	55,103,681	55,810,800	57,243,064
Semen straws sales	4,180,971	5,769,348	7,028,308	9,637,337	13,700,000
Use of AI (%) ³	5.4	7.1	7.1	9.6	13.3
Embryos produced	34,076	72,050	259,252	303,237	375,894
Use of ET (%) ⁴	0.04	0.08	0.24	0.27	0.33

1 Jumlah total kepala (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2016). 2 Jumlah betina pada usia reproduksi, berdasarkan proyeksi oleh Asosiasi Inseminasi Buatan Brasil (ASBIA). 3 Proporsi relatif terhadap jumlah perempuan di usia reproduksi. Diperkirakan mempertimbangkan 1,8 sedotan per kehamilan yang sukses. 4 Proporsi relatif terhadap jumlah perempuan di usia reproduksi. Diperkirakan mempertimbangkan 2,0 ET per kehamilan yang sukses pada penerima yang diberikan.

Untuk menjawab pertanyaan ini, penting untuk menggambarkan penggunaan teknologi embrio di antara berbagai sektor peternakan dan strata produksi. Sejak awal tahun 2000, ketika IVEP komersial mulai meningkat di Brasil, hingga baru-baru ini, sebagian besar embrio dihasilkan dari breed zebu. Sebagai akibatnya, breed-breed ini mewakili database paling komprehensif yang tersedia. Pada Tabel 3, kami memperkirakan persentase anak sapi yang dilahirkan oleh ET (yang dikandung oleh embrio IVP atau IVD) relatif terhadap semua catatan kelahiran (RGN) yang dilaporkan oleh Asosiasi Brasil Peternak Zebu (Associação Brasileira dos Criadores de Zebu - ABCZ, 2017) pada periode 2005-2015

Tabel 3. Estimasi persentase catatan kelahiran (RGN) dari transfer embrio berdasarkan catatan Asosiasi Breeder Sapi Zebu Brasil, dari tahun 2005 hingga 2015 *.

Breed	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	Mean
Gir	18.8	34.9	41.2	47.5	71.0	67.1	54.3	52.1	40.2	32.9	39.0	39.8
Guzcrá	18.9	25.3	31.1	34.7	30.9	28.5	27.1	30.3	23.5	13.7	10.8	22.7
Indubrasil	21.8	22.8	7.8	0.5	6.8	51.1	29.0	17.8	24.0	2.3	27.8	16.3
Nelore	20.7	21.8	21.1	22.7	21.0	19.5	22.2	21.7	19.6	9.1	9.0	17.8
Sindi	0.0	0.1	13.2	19.6	29.4	26.8	21.6	28.6	21.5	25.4	28.8	16.5
Tababuã	4.5	6.5	7.8	6.9	6.0	8.3	7.3	6.9	3.0	2.8	5.4	5.5
Cangaian	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	7.7
Brahman	63.6	78.0	73.9	55.6	46.4	48.3	50.1	40.5	29.8	9.4	8.7	45.5
Total	21.5	24.1	23.7	25.1	25.0	23.7	25.1	24.0	20.3	10.2	10.1	19.7

Berdasarkan proyeksi tingkat kehamilan 40% relatif terhadap jumlah total embrio yang ditransfer di sebelumnya tahun.

Hasil proyeksi ini menunjukkan skenario yang sama sekali berbeda dibandingkan dengan data ET secara keseluruhan, dengan akuntansi ET untuk 19,7% mengesankan dari semua anak sapi ras yang didaftarkan oleh ABCZ. Karena zebu adalah bagian dari sebagian besar sapi Brasil dan peternakan sapi perah (baik sebagai ras murni atau persilangan), setiap kemajuan genetik dalam B. indicus sangat mempengaruhi indeks produktivitas ternak nasional. Dampak semacam itu kemungkinan besar adalah didorong oleh penggunaan intensif teknologi embrio dalam 10-15 tahun terakhir. Hasil dari program pemuliaan Girolando (Gir x Holstein crosses), misalnya, mendukung teori ini. Lebih dari 600 dari 1.000 sapi Girolando, peringkat menurut prestasi genetik untuk produksi susu (Silva et al., 2016), dihasilkan oleh ET (IVP atau IVD embrio).

Pada Tabel 3 kami menyediakan data untuk menunjukkan bahwa penggunaan ET tidak seragam di antara breed zebu. Dalam jumlah absolut, Nelore menyumbang sebagian besar embrio (76,8%) yang diproduksi antara 2005 dan 2015. Meskipun demikian, kontribusi relatif ET untuk produksi anak lembu Nelore (17,8%) lebih rendah (meskipun lebih stabil) daripada beberapa breed lainnya. Rata-rata, ET digunakan lebih intensif pada wanita Brahman dan Gir (masing-masing 45,5 dan 39,8%), tetapi dalam kedua kasus angka-angka ini berfluktuasi, dengan puncak pada tahun 2006 untuk yang sebelumnya (78,0%) dan 2009 untuk yang terakhir (71,0%). Dalam dua breed khusus ini, osilasi semacam itu mungkin terkait dengan penggunaan ET sementara untuk meningkatkan jumlah hewan daripada untuk seleksi genetik, karena permintaan yang ditekan untuk donor oosit potensial.

Industri embrio Brasil dalam konteks dunia

Peningkatan luar biasa dalam produksi embrio yang disebabkan oleh penggunaan teknologi in vitro juga mengubah posisi Brasil di peringkat dunia. Pada akhir 1990-an, industri embrio Brasil sudah sangat aktif dan negara peringkat di antara TOP 5 dalam produksi embrio sapi (Thibier, 2000). Setelah munculnya IVEP komersial, partisipasi Brasil dalam jumlah total dunia meningkat dua kali lipat (dari 14,3% pada tahun 1999 menjadi 33,9% pada tahun 2012) dan negara ini menjadi produsen embrio bovine IVP terbesar (Tabel 4). Menariknya, pada hari-hari awal IVEP (hingga 2005), pasar embrio Brasil menyimpang dari tren yang diamati di negara lain, terutama dari mereka yang memiliki produksi embrio yang relevan. Oleh karena itu, keberhasilan komersial IVEP di Brasil tampaknya merupakan hasil kekhususan pasar internal Brasil, seperti nilai ekonomi tinggi dan hasil oosit yang lebih besar dari breed zebu.

Tabel 4. Pangsa Brasil dalam produksi embrio bovine in vivo, in vitro, dan total dunia, dari 2005 hingga 2015.

	<i>In vivo</i>			<i>In vitro</i>			Total		
	Brazil	World	%	Brazil	World	%	Brazil	World	%
2015	22,355	660,221	3.4	353,539	612,709	57.7	375,894	1,272,930	29.5
2014	43,337	614,464	7.1	348,468	590,359	59.0	391,805	1,204,823	32.5
2013	50,455	729,246	6.9	366,517	546,628	67.1	416,972	1,275,874	32.7
2012	52,719	699,585	7.5	334,913	443,533	75.5	387,632	1,143,118	33.9
2011	32,646	732,862	4.5	318,116	453,471	70.2	350,762	1,186,333	29.6
2010	38,974	732,227	5.3	264,263	450,549	58.7	303,237	1,182,776	25.6
2009	42,397	704,230	6.0	255,993	378,244	67.7	298,390	1,082,474	27.6
2008	69,527	746,250	9.3	220,425	330,953	66.6	289,952	1,077,203	26.9
2007	57,368	763,467	7.5	212,441	434,581	48.9	269,809	1,198,048	22.5
2006	83,741	777,747	10.8	204,402	441,364	46.3	288,143	1,219,111	23.6
2005	122,210	789,972	15.5	137,042	330,647	41.4	259,252	1,120,619	23.1

Tren terbaru dalam angka Brasil dan internasional Namun, mengubah persepsi ini. Penggunaan IVEP telah meningkat secara konsisten dalam 5 tahun terakhir di Eropa dan Amerika Utara, dengan mempertimbangkan angka absolut (+71.5 dan +337.4%; Eropa dan Amerika Utara, masing-masing) atau proporsi total produksi embrio (+41.3 dan +214.5 %; masing-masing), dan dapat menggantikan MOET sebagai sumber utama embrio dalam waktu dekat (Stroud, 2012; Perry, 2013, 2014, 2015, 2016).

Sebaliknya, produksi embrio dari B. taurus dan breed susu lainnya meningkat di Brasil, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1 dan 2. Secara keseluruhan, tren umum adalah bahwa fitur dari industri embrio akan menjadi lebih serupa di seluruh dunia, terlepas dari perbedaan regional. (Tabel 5). Ini mungkin akan berkontribusi pada peningkatan permintaan untuk perdagangan embrio internasional dan juga merangsang partisipasi yang lebih besar dari perusahaan pembiakan hewan besar dalam industri embrio, seperti yang kita lihat saat ini untuk air mani ternak.

Tabel 5. Produksi dunia embrio sapi pada tahun 2015, menurut wilayah, industri (susu atau daging sapi), dan teknologi yang digunakan (in vivo derived - IVD atau in vitro yang diproduksi - IVP).

Region	IVD				IVP				Total
	Dairy	Beef	Subtotal	%	Dairy	Beef	Subtotal	%	
Africa	402	5,132	5,534	59.7	0	3,733	3,733	40.3	9,267
Asia	16,057	89,628	105,685	91.8	1,162	8,276	9,438	8.2	115,123
Europe	104,174	23,806	127,980	90.3	12,840	940	13,780	9.7	141,760
North America	127,613	232,407	360,020	62.9	105,198	106,848	212,046	37.1	572,066
Oceania	2,178	9,009	11,187	74.2	3,892	0	3,892	25.8	15,079
South America	8,636	41,179	49,815	11.9	208,752	161,068	369,820	88.1	419,635
Total	259,060	401,161	660,221	51.9	331,844	280,865	612,709	48.1	1,272,930

Diadaptasi dari Perry (2016).

Amerika Serikat saat ini adalah pemimpin global dalam produksi embrio total (IVD plus IVP; Tabel 6) dan dapat mengambil alih kepemimpinan Brasil dalam produksi embrio in vitro, karena teknologi ini menggantikan MOET, yaitu, tanpa peningkatan lebih lanjut dalam total produksi embrio. Dengan mempertimbangkan rasio antara produksi embrio dan populasi ternak, Belanda adalah negara yang paling intensif menggunakan teknologi embrio, diikuti oleh Kanada. Menurut kriteria ini, Brasil hanya menempati urutan ke 11. Namun demikian, mengingat bahwa Brasil memiliki kawanan ternak komersial terbesar di dunia, produksi ternak sangat penting bagi ekonomi negara, dan bahwa ada tekanan yang terus-menerus untuk meningkatkan produktivitas sapi, kami percaya bahwa ada ruang untuk peningkatan berkelanjutan dalam produksi embrio dalam waktu dekat, yang akhirnya dapat mengubah posisi pada peringkat ini.

Tabel 6. Peringkat negara berdasarkan proporsi embrio yang dihasilkan relatif terhadap ukuran kawanan ternak, berdasarkan data dari tahun 2014.

Country	Embryos produced	Cattle population ¹	Intensity of use of ET (%)	Rank
The Netherlands	38,637	4,169,000	0.93	1st
Canada	87,113	12,220,000	0.71	2nd
Luxembourg	1,282	198,780	0.64	3rd
USA	506,626	88,526,000	0.57	4th
Finland	3,617	914,439	0.40	5th
Italy	19,355	5,756,072	0.34	6th
Denmark	4,428	1,563,535	0.28	7th
Switzerland	3,397	1,562,801	0.22	8th
Belgium	5,138	2,477,236	0.21	9th
France	38,422	19,095,797	0.20	10th
Brazil	391,805	212,366,132	0.18	11th
Panama	2,708	1,625,200	0.17	12th
Germany	20,913	12,742,190	0.16	13th
Hungary	675	782,000	0.09	14th
Spain	4,900	6,078,700	0.08	15th

Food Agriculture Organization (FAO; 2014).

Kesimpulan

Memprediksi perkembangan industri embrio selalu merupakan tugas yang kompleks, karena sifat dinamis dari produksi ternak dan kemajuan yang berkesinambungan dalam 'keadaan seni' teknologi embrio. Meskipun demikian, jumlah dan tren yang diamati dalam produksi embrio dalam dekade terakhir menunjukkan beberapa skenario yang mungkin untuk industri dalam waktu dekat:

1. Meskipun retraksi saat ini dalam kegiatan, ET masih digunakan dalam persentase yang rendah dari betina dan ternak di Brasil. dan, oleh karena itu, ada potensi besar untuk meningkatkan produksi embrio karena lebih banyak peternakan mengadopsi teknologi ini untuk meningkatkan produksi dan produktivitas, yang juga diprediksi untuk AI (Baruselli et al., 2012). Siklus ekspansi baru dalam penggunaan ET, bagaimanapun, lebih mungkin terjadi terkait dengan pasokan anak sapi persilangan untuk peternakan sapi perah dan sapi, bukan program pemuliaan hewan;
2. Seperti yang pertama kali diamati di Brasil, IVEP cenderung menjadi teknik pilihan untuk ET di seluruh dunia. Ini akan mengurangi perbedaan regional dalam sistem produksi embrio, serta mengurangi biaya dan meningkatkan skala produksi embrio, yang mungkin meningkatkan perdagangan embrio nasional dan internasional. Akibatnya, pasar embrio internasional dapat menjadi lebih mirip dengan pasar air mani;

3. Dalam kedua skenario yang dijelaskan di atas, pengembangan strategi kriopreservasi yang sukses adalah kunci untuk memperluas industri embrio, seiring dengan kesepakatan protokol sanitasi dan peraturan untuk ekspor / impor embrio IVP.

Ucapan Terima Kasih

Para penulis mengucapkan terima kasih kepada komite statistik SBTE dan Komite Pengambilan Data IETS untuk data produksi embrio Brasil dan dunia. Mereka juga berterima kasih kepada asosiasi peternak berikut untuk informasi tentang transfer embrio: ABCZ, ABCBRH, ABCGPS, ABCG, ABCM, ABC - Herd Book Collares, ABCSS.

Referensi

Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ). 2017. Estatísticas. Tersedia di: http://www.abcz.org.br/conteudos/tecnica/estatistica_1939-2016.xls. Baruselli PS, Sales JNS, RV Sala, Vieira LM, Sa Filho MF. 2012. Evolusi sejarah dan perspektif program inseminasi buatan berjangka waktu di Brasil. *Reprod Anim*, 9: 139-152. Organisasi Pertanian Pangan (FAO). 2014. Inventaris ternak. Tersedia di: <http://www.fao.org/firostat/en/#data/QA>. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2016. Indicadores de produção. Tersedia di: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria>. Perry G. 2013. 2012 statistik pengumpulan embrio dan transfer pada hewan ternak domestik. *Embryo Transfer Newsl*, 31 (4): 24-46. Perry G. 2014. 2013 statistik pengumpulan embrio dan transfer pada hewan ternak domestik. *Embryo Transfer Newsl*, 32 (4): 14-24. Perry G. 2015. 2014 statistik pengumpulan embrio dan transfer pada hewan ternak domestik. *Embryo Transfer Newsl*, 33 (4): 9-18. Perry G. 2016. Statistik pengumpulan embrio dan transfer 2015 pada hewan ternak domestik. *Embryo Transfer Newsl*, 34 (4): 10-24. Pontes JH, Silva KC, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GM, Sanches BV, JP Porcionato, Vieira PH, Faifer FS, Sterza FA, Schenk JL, Seneda MM. 2010. Produksi embrio in vitro skala besar dan tingkat kehamilan dari Bos taurus, Bos indicus, dan sapi perah indicus-taurus menggunakan sperma yang dikuliti. *Theriogenology*, 74: 1349-1355. Sartori R, Prata AB, Figueiredo ACS, Sanches BV, Pontes GCS, Viana JHM, Pontes JH, Vasconcelos JLM, Pereira MHC, Dode MAN, Monteiro Jr PLJ, Baruselli PS. 2016. Pembaruan dan ikhtisar tentang teknologi reproduksi yang dibantu (ART) di Brasil. *Reprod Anim*, 13: 300-312. Silva MVGB, Martins MF, Cembranelli MAR, Paiva LC, Panetto JCC, Alves BRC, Campos MM, Carvalho BC, Machado MA, Faza DRLR. 2016. Girolando mengembangkan program perbaikan genetik. Ringkasan Sire. Hasil Uji Progeni. Juni 2016. Juiz de Fora: Embrapa Sapi Perah. 50 pp. (Embrapa Dairy Cattle. Documents, 190). Stroud B. 2012. Tahun 2011 di seluruh dunia statistik transfer embrio pada hewan ternak domestik .. *Embryo Transfer Newsl*, 30 (4): 16-26. Thibier M. 2000. The IETS statistik transfer embrio di peternakan di dunia untuk tahun 1999: catatan baru untuk embrio sapi in vivo yang ditransfer. *Embryo Transfer Newsl*, 18 (4): 24-28. Viana JHM, Siqueira LGB, Palhao MP, Camargo LSA. 2010. Penggunaan teknik fertilisasi in-vitro dalam dekade terakhir dan pengaruhnya pada industri embrio Brasil dan produksi hewan. *Acta Sci Vet*, 38: s661-s674. Viana JHM, Siqueira LGB, Palhao MP, Camargo LSA. 2012. Fitur dan perspektif industri embrio Brasil in vitro.