

**ВЫЖИВАЕМОСТЬ ЭМБРИОНОВ И ПОВЫШЕНИЕ ТЕМПОВ
ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОГРЕССА В МОЛОЧНЫХ СТАДАХ***

(обзор)

О.А. СКАЧКОВА , А.В. БРИГИДА

Непрерывность генетического прогресса и применение передовых технологий при разведении высокопродуктивного скота — отличительные черты современного молочного скотоводства (G.R. Wiggans с соавт., 2017; B.V. Sanches с соавт., 2019). На примере коров голштинской породы североамериканской селекции показано, что за 50-летний период (1963-2013 годы), в течение которого надои молока удвоились (с 6619 кг до 12662 кг), генетические изменения составили более 56,0 % (A. Garcia-Ruiz с соавт., 2016). Генетические усовершенствования, направленные на повышение молочной продуктивности, повлекли за собой снижение репродуктивной способности и нарушение здоровья у коров (J. Kropp с соавт., 2014; L. Hyun-Joo с соавт., 2015, В. Fessenden с соавт., 2020), что до сих пор остается глобальной проблемой (E.S. Ribeiro с соавт., 2012; K.J. Perkel с соавт., 2015). В 30-50 % случаев высокоудойные коровы подвержены маститам, метритам, хромоте и другим заболеваниям (I. Cruz с соавт., 2021), а при оплодотворении 90-95 % средний показатель отела составляет около 40-50 % (M.G. Diskin с соавт., 1980; P. Humblot с соавт., 2001). Эмбриональный период у коров продолжается до 42-45-х сут стельности (J. Peippo с соавт., 2011) и характеризуется высокой (до 40 %) эмбриональной смертностью (D.C. Wathes, 1992; K.J. Perkel с соавт., 2015; P. Rani с соавт., 2018), полифакторная этиология которой до сих пор не изучена. Потери генетического потенциала (нерожденные быки-производители, ремонтные телки, матери быков-производителей, доноры эмбрионов) приводят к замедлению селекционного процесса в молочных стадах (M. Ptaszynska, 2009). Настоящий обзор отражает современные данные о генетической предрасположенности эмбриона к выживанию как одному из важных факторов, детерминирующих наступление и развитие стельности у молочных коров. Приведены данные о выживаемости бластоцист в стрессовых условиях их получения *in vivo* или *in vitro*, после криоконсервации и оттаивания (J.L.M. Vasconcelos с соавт., 2011; C. Galli, 2017; H. Erdem с соавт., 2020) и бисекции (микрохирургическое деление эмбриона пополам с получением двух деми-эмбрионов) (Y. Hashiyada, 2017). Данные о способности эмбрионов к выживанию с генетической точки зрения становятся все более объективными по мере обнаружения генов-кандидатов, связанных с высокой компетентностью эмбриона к развитию (M.C. Summers и J.D. Biggers, 2003; A. El-Sayed с соавт., 2006). Молекулярно-генетические технологии позволяют исследовать весь набор генов, которые обеспечивают устойчивое развитие бластоцисты (A.M. Zolini с соавт., 2020), а также эпигенетические изменения паттернов экспрессии генов в разные моменты времени до и после имплантации эмбриона (A. Gad с соавт., 2012; P. Humblot, 2018). Это открывает перспективы для разработки методов маркер-ориентированной диагностики нарушений эмбрионального развития, а также методов регуляции экспрессии эмбриональных генов, что внесет вклад в повышение стельности у генетически ценных коров и приведет к увеличению темпов генетического прогресса в популяциях молочного скота.

Ключевые слова: геномная селекция, транскриптомы, высокоудойные коровы, эмбриональная смертность, генетический прогресс, молекулярно-генетические маркеры.

Скот голштинской породы распространен в стадах во многих странах мира (1). Вместе с тем повышение молочной продуктивности вызвало многочисленные нарушения здоровья у коров (в 30,0-50,0 % случаев от всех зарегистрированных заболеваний это маститы, метриты, хромота, молочная лихорадка, кетоз) (2), а также привело к снижению репродуктивной способности (3-7), что стало следствием односторонних селекционно-генетических улучшений и оказывает негативное влияние на современное молочное скотоводство (8-10).

Средний показатель отела у высокоудойных коров составляет около 40-50 % при оплодотворении 90-95 % (11, 12). К частым явлениям относятся высокая (до 40,0 %) эмбриональная смертность (13-15) в период от оплодотворения до 42-45 сут стельности (16), гибель плода между 40-ми и

*Работа выполнена в рамках Госзадания №121052600344-8.

80-ми сут стельности наступает в 2,0-6,0 % случаев, в оставшийся срок — в 4,0 % случаев (17). Кроме того, промышленные условия содержания приводят к травмам, стрессам, гипертермии, пирексии (18) и, следовательно, к более длительному периоду между отелами, бесплодию, значительной доле преждевременной выбраковки животных (19). Это снижает темпы генетического прогресса — постоянного улучшения показателей продуктивности, обеспечиваемого непрерывностью селекционного процесса, эффективность которого зависит от быстрого воспроизводства животных с экономически значимыми генотипами.

Этиология высокой эмбриональной смертности, которую регистрируют в стадах, до сих пор остается не изученной (20). Среди факторов, влияющих на эмбриональную гибель у стельных высокоудойных коров, рассматривают среду яйцеводов, регулирующую развитие эмбриона вплоть до стадии бластоцисты (21-23), и среду матки перед имплантацией эмбриона (24, 25). Также акцентируют внимание на естественном механизме адаптации бластоцисты к условиям среды, обусловленном генетической предрасположенностью эмбриона к выживанию (17, 26, 27), которую определяют наследственные факторы (28) — генетическая информация, переданная эмбриону от яйцеклетки (29) и от сперматозоида (30, 31).

Молекулярно-генетические исследования взаимосвязи между экспрессией генов и ранним эмбриональным развитием или его задержкой могут дать понимание генетических и эпигенетических механизмов, обеспечивающих жизнеспособность эмбриона.

Цель настоящего обзора — обобщение данных о способности эмбрионов крупного рогатого скота (КРС) к выживанию при получении *in vivo* или *in vitro*, после криоконсервации и оттаивания, микрохирургического деления, при трансплантации и наступлении стельности.

Технология трансплантации эмбрионов (ТТЭ), широко практикуемая при разведении высокопроизводительных животных, позволяет за короткий период получить большое количество эмбрионов от генетически ценных коров-доноров, оплодотворенных семенем выдающихся быков-производителей (32, 33). Среди методов, составляющих основу ТТЭ, важное место занимают МОЭТ (метод множественной овуляции и эмбриотрансплантации), посредством которого получают эмбрионы *in vivo* (34), а также IVP (метод *in vitro* production), предназначенный для получения эмбрионов *in vitro* (35).

Перенос эмбрионов, полученных *in vivo* или *in vitro*, менее ценным телкам-реципиентам обеспечивает быстрое воспроизводство большего количества потомков, чем при естественной репродукции (36, 37). Согласно данным Международного общества по трансплантации эмбрионов (International Embryo Transfer Society, IETS), по всему миру в период с 2000 по 2019 год было получено более 20 млн эмбрионов молочного и мясного КРС, а в 2019 году в 39 странах, на долю которых приходится примерно половина мирового поголовья (Россия, США, Канада, Бразилия, Франция, Италия и др.), произведено 1419336 коммерческих эмбрионов, пригодных для пересадки (38). При ТТЭ значительная часть эмбрионов *in vivo* дегенерирует и погибает, не достигнув стадии бластоцисты: на 6-7-е сут у суперовулированных коров-доноров молочного направления продуктивности при оплодотворении 85-95 % извлекали примерно 50 % жизнеспособных эмбрионов (39).

Выживаемость эмбрионов при использовании метода МОЭТ. Суть метода МОЭТ состоит в том, что у генетически ценной коровы — донора эмбрионов искусственно активируют рост и созревание

множества фолликулов, продуцирующих яйцеклетки (индукция суперовуляции), посредством введения препаратов фолликулостимулирующего гормона (ФСГ). На 7-е сут после осеменения коровы-донора эмбрионы *in vivo* извлекают из ее репродуктивных органов и пересаживают (свежеполученными или замороженно-оттаянными) менее ценным реципиентам (40). Технологический процесс и средства, используемые при этом, подразумевают наличие стресс-факторов и травматизацию как получаемых эмбрионов, так и коров-доноров. Коровы-доноры попадают в стрессовую ситуацию уже при подготовке к процедуре индукции суперовуляции, когда животное отлавливают и фиксируют. Препарат ФСГ применяют в строгом соответствии со схемой (8-10-кратное введение каждые 12 ч в течение 4-5 сут). В ответ на многофакторные воздействия в организме изменяются физиологические и метаболические процессы. Количество эмбрионов *in vivo*, продуцируемых коровами-донорами, варьирует в широком диапазоне (41-43). Согласно международной практике, у 30 % доноров отсутствует ответная реакция яичников на экзогенные гонадотропины (44), 30 % доноров проявляют крайне низкую ответную реакцию яичников с числом овуляций 1-3, что соответствует естественному процессу овуляции, и только от одной трети доноров получают суперовуляторный ответ с числом овуляций от 5 до 12 (45-47).

Яйцевод самки КРС служит местом оплодотворения яйцеклетки и нахождения эмбриона в течение первых 4 сут. На 16-клеточной стадии развития (ранняя морула) эмбрион продвигается в полость матки, где развивается до стадии морулы и на 7-е сут — до стадии бластоцисты (предимплантационная стадия развития) (48, 49). На 8-9-е сут полость бластоцисты значительно увеличивается в размере, ее блестящая оболочка (*zona pellucida*) растягивается, становится тонкой и разрывается (процесс хэтчинга), выводя эмбрион из *zona pellucida* (39, 50). Далее бластоциста прикрепляется к эндометрию матки, низкая рецептивность которого становится причиной неудач при имплантации эмбриона, в том числе при проведении программ ЭКО. Процессы, определяющие готовность эндометрия к принятию эмбриона, у КРС изучены недостаточно (51), в то время как у человека известны гены семейства *HOX* (*Homeobox*) и кодируемые ими белки, например *HOX10* и *HOX11*, участвующие в регуляции имплантации и служащие ключевыми регуляторами процессов рецептивности эндометрия (52, 53).

В программах МОЭТ 7-суточные эмбрионы извлекают из репродуктивных органов коровы-донора нехирургическим способом с помощью специализированного оборудования. Техническое изъятие эмбриона из естественной среды усиливает стресс (54). Кроме того, при извлечении происходят неизбежные потери эмбрионов, составляющие от 60-80 до 20-30 % от подсчитанного количества желтых тел (55).

После извлечения эмбрионы помещают в искусственно созданную среду и маркируют на основе Руководства Международного общества по трансплантации эмбрионов (*International Embryo Transfer Society, IETS*) (56, 57). Определяют стадии развития эмбрионов (коды стадий от 1 до 8) и оценивают их качество на пригодность к пересадке (коды качества от 1 до 4). Эмбрионы с кодом качества 1 (отлично или хорошо), находящиеся на стадиях развития от компактной морулы (код стадии 4) до бластоцисты (коды стадий 5 или 6), обеспечивают самые высокие показатели стельности, в том числе после криоконсервации. Эмбрионы с кодами качества 2 (удовлетворительно) и 3 (плохо) после криоконсервации демонстрируют низкие показатели стельности у реципиентов, поэтому их используют для пересадки только в свежеполученном виде. В эмбриосборах, помимо эмбрионов, при-

годных для пересадки, как правило, присутствуют ооциты (неоплодотворенные яйцеклетки), одноклеточные или дегенерировавшие эмбрионы, которые нежизнеспособны (код качества 4) и подлежат утилизации. Согласно многолетней мировой практике, в эмбриосборах выявляют в среднем 58,0 % эмбрионов, пригодных для пересадки, а остальными оказываются дегенерировавшие эмбрионы (11,0 %) и неоплодотворенные яйцеклетки (31,0 %) (58). После проведения одной сессии МОЭТ от одной коровы-донора получают в среднем 6,2 эмбрионов *in vivo*, пригодных для пересадки (59), а за 1 год при применении этого метода каждые 45 сут — более 40 эмбрионов *in vivo* (60). Зарегистрированы случаи, когда за одну сессию стимуляции суперовуляции от одной коровы-донора получали до 50 эмбрионов *in vivo*, пригодных к пересадке (45). О способности к выживанию свежеполученных эмбрионов *in vivo*, пересаженных реципиентам, свидетельствует частота наступления стельности 45,0-55,0 %, после пересадки замороженно-оттаянных эмбрионов этот показатель составляет 30,0-45,0 % (61-65). Следовательно, значительная часть эмбрионов, неоднократно подвергнутых технологическим стрессам, демонстрируют способность к выживанию, что подтверждается рождением телят.

Выживаемость эмбрионов в системе IVP. Метод IVP еще более агрессивен в сравнении с МОЭТ, однако оба эти метода служат важным инструментом в скотоводстве для увеличения числа потомков от животных, имеющих высокую генетическую ценность, что максимизирует репродуктивную способность коров в течение более короткого периода времени (66).

При производстве эмбрионов IVP яйцеклетки получают прижизненно или *post mortem* (после убоя животного). Применяется метод трансвагинальной аспирации, который широко известен как метод OPU (*ovum pick-up*) — сбор незрелых яйцеклеток (ооцитов) из яичников коров-доноров под ультразвуковым контролем (33, 67). Суть IVP заключается в том, что полученные ооциты культивируют в лаборатории в условиях *in vitro* для дозревания (*in vitro maturation*, IVM), искусственно созревшие ооциты подвергают экстракорпоральному оплодотворению (*in vitro fertilization*, IVF), после чего оплодотворенные ооциты (зиготы) культивируют в ростовой среде (*in vitro culture*, IVC) для развития эмбриона до стадии бластоцисты (68). Ооциты способны возобновлять мейоз при IVM, дробиться после оплодотворения (IVF), развиваться до стадии бластоцисты при IVC и вызывать стельность, приводящую к рождению здорового потомства, что в целом трактуется как компетентность ооцитов к развитию (69).

На компетентность ооцитов к развитию, помимо гормональной стимуляции, фазы фолликулярной волны, диаметра фолликулов, условий кормления и возраста донора, оказывает воздействие процесс культивирования *in vitro* (70). Перенос ооцитов из одной культуральной среды в другую, а также состав среды и условия культивирования при IVC могут вызывать у эмбриона физико-химические (температура, осмоляльность и pH), окислительные (прооксидантный и антиоксидантный баланс) и энергетические (использование и накопление питательных веществ, синтез АТФ) стрессы, приводящие к неправильной регуляции гомеостаза на раннем этапе развития (71).

С использованием молекулярных технологий стало возможным изучение различных показателей развития эмбриона на всех этапах IVP. Показано, что развитие эмбрионов при определенных условиях культивирования приводит не только к изменению экспрессии генов, связанных с метаболизмом и ростом, но также к изменению концептуса и развития плода после

переноса реципиентам (72). Реакции эмбриона на стресс при культивировании *in vitro* коррелируют с транскриптомными изменениями, связанными с энергетическим метаболизмом, сигнальными путями и ремоделированием внеклеточного матрикса (71, 72). Предполагается, что возникающие в период бластуляции транскриптомные изменения — это результат адаптации эмбриона к факторам среды, причем такая адаптация при неоптимальных условиях культивирования может обусловить эпигенетические изменения, приводящие к метаболическому дисбалансу, негативно влияющему на процесс имплантации, развитие эмбриона и его здоровье в постнатальный период (71, 73).

Эмбрионы, полученные из ооцитов, созревших *in vitro*, менее жизнеспособны в сравнении с эмбрионами, полученными из естественно овулирующих ооцитов (74-78). Как показывает практика, 90 % ооцитов, извлеченных из фолликулов коровы-донора, способны к мейозу и созреванию, до 2-клеточной стадии развиваются 80 % оплодотворенных ооцитов (зиготы), но из них только 30-40 % могут развиваться до стадии бластоцисты (39, 79-81). На одной корове-доноре метод IVP применяют каждые 15 сут, получая в течение одного года более 72 эмбрионов *in vitro*, из расчета, что за один технологический цикл в среднем производится три эмбриона *in vitro* (60). После пересадки эмбрионов *in vitro* частота наступления стельности у реципиентов ниже на 10-40 % в сравнении с эмбрионами *in vivo*, к тому же в течение первых 6 нед прерываются 60,0 % стельностей, а живые телята рождаются в 27 % случаев (82). В сравнении с эмбрионами *in vivo* эмбрионы *in vitro* характеризуются более низкой криотолерантностью при криоконсервации (83-85), а показатели приживляемости витрифицированных эмбрионов *in vitro*, зафиксированные B.V. Sanches с соавт. (86) на 30-е сут после пересадки, составляли $35,89 \pm 3,87$ % (84/234), в то время как после пересадки свежеполученных эмбрионов — $51,35 \pm 1,87$ % (133/259). Вместе с тем наблюдаемый (пусть и небольшой) процент телят, развившихся из ооцитов, подвергнутых многочисленным манипуляциям вне их естественной среды, свидетельствует о наличии механизма адаптации, понимание которого станет возможным при накоплении экспериментальных данных.

Микрохирургическое деление эмбриона пополам и выживаемость деми-эмбрионов. КРС — это одноплодные животные, рождающие в год одного теленка. При естественном размножении появление телят-близнецов (моно- и дизиготные близнецы) происходит крайне редко — в 3-5 % случаев у молочного скота и не более чем в 1 % случаев у мясного скота, еще меньше процент рождения монозиготных близнецов (87). У молочного скота вероятность рождения монозиготных близнецов встречается не чаще, чем в 0,001 % отелов (88).

Разработанный метод микрохирургического деления эмбриона *in vivo* пополам (бисекция) (89-92) предлагал простой способ увеличения количества эмбрионов *in vivo* в 2 раза. При бисекции эмбрион (на стадии морулы или бластоцисты) размещают на лабораторном часовом стекле или в чашке Петри с искусственной питательной средой. После фиксации эмбрион под микроскопом разделяют на две половины (93, 94), которые должны быть одинакового размера, а бластомеры и клетки трофобласта — распределяться равномерно (95). Метод бисекции основан на уникальном свойстве тотипотентности, которое гаметы млекопитающих (яйцеклетка и сперматозоид) приобретают сразу после оплодотворения: зигота начинает дробиться, образуя бластомеры, при этом каждый бластомер способен генерировать полноценный организм, но в процессе развития эмбриона с началом клеточной дифференцировки эта способность утрачивается (96).

После микрохирургического деления эмбриона каждая из половинок в течение нескольких часов (от 1 до 3 ч) в условиях питательной среды при комнатной температуре восстанавливает сферическую форму, типичную для эмбриона (деми-эмбрион) (89, 97). Сразу после восстановления деми-эмбрионы можно трансплантировать реципиентам.

Эмбриональную гибель у деми-эмбрионов фиксируют значительно чаще в сравнении с интактными (неповрежденными) эмбрионами (98), но если деми-эмбрион прижился, то он развивается аналогично интактному (95). По данным Y. Hashiyada (99), частота наступления стельности у реципиентов после пересадки деми-эмбрионов *in vivo* составляет 36,4-53,2 %, по данным М. Lopatárova с соавт. (100) — 48,8-56,5 %. Отсутствие наступления стельности после пересадки деми-эмбрионов в основном связывают с повреждением и потерей бластомеров во время процедуры бисекции, а также с недостаточно эффективными способами культивирования половинок разделенного эмбриона (101). Несмотря на повреждения, нанесенные эмбриону при бисекции, в течение нескольких десятков лет во всем мире из деми-эмбрионов были получены тысячи телят-близнецов без признаков аномалий развития (102). Однако метод бисекции не получил широкого практического распространения, поскольку в условиях фермерского хозяйства выполнять такие манипуляции затруднительно (33).

Развитие молекулярно-генетических технологий расширило область применения метода бисекции, который позволяет проводить научные исследования на монозиготических генетически гомологичных деми-эмбрионах (99). Так, были изучены паттерны экспрессии генов, связанных с генетически обусловленной способностью эмбриона к выживанию в системе мать—эмбрион. В исследованиях А.М. Zolini с соавт. (17, 27) для идентификации маркерных генов, коррелирующих с приживляемостью эмбриона, один деми-эмбрион пересаживали реципиенту, а вторую часть использовали для RNA-seq анализа. Метод бисекции также применяют в племенных хозяйствах, получающих спермопродукцию, для тестирования быков-производителей по потомству. При этом сокращается интервал между поколениями, что позволяет использовать таких быков в более молодом возрасте (99).

Генетически обусловленная способность эмбриона к выживанию. Полиморфизм генов признан наиболее эффективным механизмом, обеспечивающим как гомеостаз организма, так и динамическое постоянство популяции (103). Важную роль играет регуляция генной активности и активация регуляторных генов (104). Благодаря полиморфизму генов эмбрион запрограммирован на устойчивость к повреждениям, а его генотип обладает индивидуальным потенциалом изменчивости в зависимости от условий среды (103, 105).

До появления современных молекулярно-генетических технологий изучение генов, участвующих в раннем эмбриональном развитии, было затруднено, однако в настоящее время возможны исследования всего генома с использованием усовершенствованных микрочипов, которые позволяют проводить профилирование экспрессии генов на основе количественных измерений (106). А.М. Zolini с соавт. (17, 27) изучили генную активность у выживших и не выживших после пересадки эмбрионов КРС. У эмбрионов, полученных *in vivo*, среди генов, дифференциально экспрессируемых у жизнеспособных и нежизнеспособных эмбрионов, наиболее транскрибируемым оказался кластер, связанный с мембранными белками, особенно с теми, которые вовлечены в развитие и функционирование нервной системы, в частности в формирование обонятельной функции (17). Кроме того, у вы-

живших после трансплантации эмбрионов *in vivo* были обнаружены гены, участвующие в окислительном фосфорилировании, активность которых оказалась подавленной (17). У прижившихся эмбрионов, полученных *in vitro* (27), многие дифференциально экспрессируемые гены, задействованные в обеспечении выживания, были связаны с клеточными реакциями на стрессы, что, как предположили авторы, является следствием нарушений на этапе искусственного культивирования эмбриона. Также оказалось, что набор генов, ассоциированных с выживанием эмбрионов, и биологические функции, связанные с этими генами, в значительной степени различны у эмбрионов, полученных *in vivo* и *in vitro*.

В работе R. Salehi с соавт. (106) у КРС в биопсийных образцах 7-суточных бластоцист *in vivo* были обнаружены 6765 генов, ассоциированных с многочисленными биологическими процессами, такими как регуляция перехода метафаза-анафаза клеточного цикла, регуляция сегрегации хромосом, трансляция митохондрий, убиквитинирование, связанное с белком K48, митотическое деление ядра. В работе A. El-Sayed с соавт. (72) при исследовании экспрессии генов в биоптатах бластоцист *in vitro*, пересаженных реципиентам, регуляция генной активности различалась в случае отсутствия стельности и при рождении телят. При этом была выявлена повышенная экспрессия ряда генов, которая коррелировала с неспособностью вызвать стельность, например *TNF* (провоспалительный цитокин), *EEF1A1* (ферментативная доставка аминоксил-тРНК к рибосоме), *PTTG1* (онкоген), *AKR1B1* (метаболизм глюкозы), *CD9* (ген-ингибитор имплантации). Гены, связанные с рождением телят, были следующими: ассоциированные с имплантацией (*COX2* и *CDX2*), с углеводным метаболизмом (*ALOX15*), с фактором роста (*BMP15*), с передачей сигнала (*PLAU*), с развитием плаценты (*PLAC8*). В бластоцистах КРС, которые культивировали *in vitro*, при профилировании транскриптов генов *IGF1R*, *IGF2R*, *OCT4*, *SOX2* и *PLAC8* K. Suwik с соавт. (78) показали изменение их экспрессии в зависимости от стадии развития и качества анализируемых бластоцист. При транскриптомном анализе бластоцист *in vitro*, полученных из ооцитов, которые подвергались воздействию повышенных концентраций неэтерифицированных жирных кислот (non-esterified fatty acids, NEFA), V. Van Hoesck с соавт. (107) обнаружили физиологические изменения развивающихся эмбрионов и снижение их выживаемости по сравнению с контролем.

В настоящее время весь набор генов и транскриптомов, связанных с характеристиками развития и выживаемости зародыша КРС, до конца не изучен. Ожидается, что изучение транскриптомных нарушений приведет к разработке способов оценки компетентности эмбриона (71, 108, 109), под которой понимают его развитие от стадии зиготы (одноклеточный эмбрион) до бластоцисты (многоклеточный эмбрион, предимплантационная стадия), способной вызвать стельность, завершающуюся рождением теленка (109).

Эпигенетический аспект выживаемости эмбриона. В живых организмах широко распространена эпигенетическая регуляция активности генов, которая не связана с изменением первичной структуры ДНК, но модифицирует работу генома в зависимости от внутренних и внешних факторов (110). Показано, что эпигенетическая регуляция осуществляется через химическую модификацию структуры ДНК (метилирование ДНК, модификации гистонов, некодирующие RNAs) или хроматина (111). Метилирование ДНК в бластоцистах — обратимый и динамический эпигенетический механизм, участвующий в ремоделировании структуры хроматина, в том числе в критических регуляторных областях генома, и тем

самым влияющий на экспрессию генов (112). На сегодняшний день у эмбрионов КРС недостаточно изучена сложная взаимосвязь между эпигенетическими модификациями, состоянием хроматина и транскрипционной активностью (111). Сравнительный анализ степени модификации тех или иных участков генома в норме и при патологии может выявить эпигенетические предикторы, ассоциированные с нарушениями в регуляции экспрессии генов, которые связаны с выживаемостью эмбриона.

Эмбрион еще при нахождении в яйцевом претерпевает эпигенетические изменения, влияющие на его последующее развитие, имплантацию и постнатальный фенотип (113, 114), что важно для обеспечения правильного набора генов, транскрибируемых во время активации эмбрионального генома (*zygotic genome activation, ZGA*) (115). После оплодотворения яйцеклетки у КРС первые зиготические деления происходят в режиме транскрипционного молчания, которое сохраняется до тех пор, пока не завершается активация эмбрионального генома. В связи с этим у ранних эмбрионов *in vitro* наблюдается повышенная чувствительность к стрессу, связанному с культивированием, в сравнении с более поздними стадиями доимплантационного развития (71). В исследовании К.В. Dobbs с соавт. (116) показаны динамические изменения метилирования ДНК у эмбрионов КРС: снижение метилирования от 2-клеточной до 6-8-клеточной стадии развития во время ZGA и увеличение — в процессе дальнейшего развития эмбриона до стадии бластоцисты, что свидетельствует о приобретении эмбриональными клетками после ZGA транскрипционной изменчивости, обеспечивающей чувствительность к внешним условиям среды (117, 118).

С расширением экспериментальных данных эпигенетические исследования паттернов экспрессии генов в ответ на изменения условий окружающей среды до и после имплантации эмбриона станут источником важной информации о регуляции эмбрионального развития у РС (119, 120).

Роль методов МОЭТ, ИVP и бисекции эмбрионов в молекулярно-генетических исследованиях эмбрионального развития. Молекулярно-генетические технологии позволяют получать огромные массивы геномной информации, связанной со многими биологическими процессами в организме животного. С помощью геномной селекции был достигнут значительный прогресс (в частности, в молочном скотоводстве) (80, 121).

До внедрения в 1980-х годах в практику животноводческих хозяйств ТТЭ из-за длительного цикла размножения и одноплодности генетический прогресс в молочных стадах был медленным (122). Появление МОЭТ и ИVP ускорило его благодаря тому, что интервал между поколениями сократился и стали использоваться лучшие самки. Сочетание этих методов с геномной селекцией по признакам молочной продуктивности еще сильнее сократило промежуток между поколениями и усилило генетический эффект вследствие высокой точности отбора (34). Пример коров голштинской породы североамериканской селекции свидетельствует о достижении генетических изменений (более 56,0 %) в организме животных в течение 50 лет (1963–2013 годы), когда годовые надои молока удвоились — с 6619 кг до 12662 кг (1). Также благодаря применению ТТЭ в сочетании с геномной селекцией в течение 7 лет (с 2008 по 2015 год) в США при получении генетически ценных коров и быков-производителей был резко сокращен интервал между поколениями — примерно с 7 лет до < 2,5 лет, а при получении быкопроизводящих коров — с 4 до 2,5 лет (1). Имеются сведения, что более 90 % скандинавских молочных коров, рожденных в Дании, Швеции и Фин-

ляндии в 2018 году, были получены от быков, возраст которых составлял всего 3,1 года (123). Следовательно, несмотря на то, что геномная селекция используется в течение относительно короткого времени, достигнутые результаты подтверждают ее положительное влияние на эффективность разведения молочного скота (1).

В настоящее время продолжают исследования набора генов и транскриптомных данных, связанных с эмбриональным развитием КРС. Ожидается, что идентификация молекулярно-генетических маркеров, специфичных для развития определенного патологического процесса у ранних эмбрионов, будет способствовать разработке методов оценки факторов патогенеза, приводящих к ранней эмбриональной смертности. В базе данных CattleQTLdb (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>) интегрируются постоянно растущие объемы данных о локусах количественных признаков QTL (quantitative trait loci), получаемых в разных странах мира при исследовании генома КРС, а также предоставлены инструменты для изучения генетических механизмов, контролирующими интересующие признаки у этого вида сельскохозяйственных животных (124). В CattleQTLdb можно быстро находить релевантную информацию о генотипе-фенотипе для анализа признаков (125), в том числе ассоциированных с различными аспектами фертильности и успешной стельности.

Результаты экспериментов по изучению транскриптомов эмбрионов (от ооцитов до поздних бластоцист) КРС, в том числе с помощью технологий секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS), обобщены на сайте <http://emb-bioinfo.fsa.ulaval.ca/IMAGE/>. Однако оценка взаимосвязи между транскриптомным профилем предимплантационной бластоцисты и наступлением стельности у самок КРС все еще затруднена, поскольку отсутствуют унифицированные алгоритмы и подходы к интерпретации данных из разных источников.

Решающими факторами, влияющими на надежность геномных оценок и прогнозов, становятся увеличение числа особей в эталонной популяции, по которой определяется взаимосвязь между фенотипами и маркерами, а также увеличение размера референтной популяции и точность интересующих фенотипов (127). Методы МОЭТ и ИVP приобретают важное значение для сохранения генетического потенциала (120), позволяя в короткий срок получать десятки сотен эмбрионов от генетически ценных животных (128). Кроме того, эмбрионы *in vitro* служат модельным объектом для молекулярных исследований биологических функций от одноклеточной стадии до бластоцисты (37) и изучения такие важных процессов, как созревание ооцитов, оплодотворение, раннее развитие и имплантация (78).

Применение бисекции распространено при изучении транскриптомов у эмбрионов в связи с наступлением стельности (17, 27).

Таким образом, методы множественной овуляции, *in vitro* дозревания, микрохирургического деления эмбрионов пополам (бисекции) и трансплантации достаточно хорошо разработаны и позволяют получать от генетически ценных коров-доноров жизнеспособные эмбрионы, которые после пересадки реципиентам приживаются и развиваются, что завершается рождением потомства. В сочетании с геномными исследованиями эти методы составляют основу современных репродуктивных биотехнологий, применяемых для ускорения генетического прогресса в стадах. К значимым факторам, детерминирующим наступление и развитие стельности, относится генетически обусловленная способность эмбриона к выживанию в разных условиях среды, поэтому поиск генов-кандидатов, связанных с эмбриональным

развитием, — важная область исследований, имеющих целью повышение стельности у высокоудойных коров. Модулирование экспрессии эмбриональных генов может стать перспективным направлением в репродукции. Для реализации такого подхода необходимы генетические и эпигенетические маркеры, диагностирующие как нарушения эмбрионального развития, так и высокую компетентность эмбриона.

*Институт инновационных биотехнологий
в животноводстве —
филиал ФГБНУ ФИЦ животноводства —
ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
127422 Россия, г. Москва ул. Костякова, 12/4,
e-mail: oaskachkova@mail.ru ✉, brigida_86@mail.ru*

*Поступила в редакцию
14 июля 2021 года*

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2021, V. 56, № 6, pp. 1063-1078

EMBRYO SURVIVAL TO ACCELERATE GENETIC PROGRESS IN DAIRY HERDS (review)

O.A. Skachkova ✉, A.V. Brigida

Institute of Innovative Biotechnology in Animal Husbandry — Branch of the Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 12/4, ul. Kostyakova, Moscow, 127422 Russia, e-mail oaskachkova@mail.ru (✉ corresponding author), brigida_86@mail.ru

ORCID:

Skachkova O.A. orcid.org/0000-0003-4960-0712

Brigida A.V orcid.org/0000-0002-0139-8087

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

The work was done within the framework of the State assignment No. 121052600344-8.

Received July 14, 2021

doi: 10.15389/agrobiology.2021.6.1063eng

Abstract

Continuity of genetic progress and the use of advanced technologies in the breeding of highly productive livestock are the distinctive features of modern dairy cattle breeding (G.R. Wiggans et al., 2017; B.V. Sanches et al., 2019). An example of Holstein cows of North American selection indicates the achievement of genetic changes (more than 56,0 %) in animals over 50 years (1963-2013), when milk yield doubled from 6619 kg to 12662 kg (A. Garcia-Ruiz et al., 2016). Along with this, genetic improvements aimed at higher milk yields have decreased the reproductive capacity and impaired health of cows (J. Kropp et al., 2014; L. Hyun-Joo et al., 2015, B. Fessenden et al., 2020) that is a global problem (E.S. Ribeiro et al., 2012; K.J. Perkel et al., 2015). High-yielding cows are 30-50 % susceptible to mastitis, metritis, lameness and other diseases (I. Cruz et al., 2021), and the average calving rate is about 40-50 % with 90-95 % fertilization (M.G. Diskin et al., 1980; P. Humblot, 2001). The embryonic period of cows which is up to 42-45 days of gestation (J. Peippo et al., 2011) is characterized by high (up to 40 %) embryonic mortality (D.C. Wathes, 1992; K.J. Perkel et al., 2015; P. Rani et al., 2018), the multifactorial etiology of which has not yet been elucidated. Loss of genetic potential (unborn bull sires, replacement heifers, mothers of bull sires, and embryo donor cows) slows down selection process in dairy herds (M. Ptaszynska, 2009). This review focuses on the genetic predisposition of the embryo to survival as one of the important factors determining the onset and development of pregnancy of dairy cows. Blastocysts retain the ability to survive in stressful conditions of in vivo or in vitro production after cryopreservation-thawing (J.L.M. Vasconcelos et al., 2011; C. Galli, 2017; H. Erdem et al., 2020) and bisection (microsurgical division of the embryo in half for two demi-embryos) (Y. Hashiyada, 2017). The information on embryo survivability becomes more genetically founded as candidate genes associated with high embryo competence to development are found (M.C. Summers and J.D. Biggers, 2003; A. El-Sayed et al., 2006). Molecular genetic technologies make it possible to study the entire set of genes that endow the blastocyst with the ability to develop sustainably (A.M. Zolini et al., 2020), as well as epigenetic changes of gene expression patterns before and after embryo implantation (A. Gad et al., 2012; P. Humblot, 2018). It will help to develop methods for marker-assessed diagnostics of embryonic disorders, to regulate embryonic genes expression, to elevate the pregnancy rate in cows possessing economically valuable traits and, finally, to accelerate genetic progress in dairy cattle populations.

Keywords: genomic selection, transcriptomes, high-yielding cows, embryonic mortality, genetic progress, molecular genetic markers.

REFERENCES

1. García-Ruiz A., Cole J.B., VanRaden P.M., Wiggans G. R., Ruiz-López F.J., Van Tassell C.P. Changes in genetic selection differentials and generation intervals in US Holstein dairy cattle as a result of genomic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(28): 3995-4004 (doi: 10.1073/pnas.1519061113).
2. Cruz I., Pereira I., Rupprechtera G., Barca J., Meikle A., Larriestra A. Clinical disease incidence during early lactation, risk factors and association with fertility and culling in grazing dairy cows in Uruguay. *Preventive Veterinary Medicine*, 2021, 191: 105359 (doi: 10.1016/j.prevet-med.2021.105359).
3. Royal M., Mann G.E., Flint A.P. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. *The Veterinary Journal*, 2000, 160(1): 53-60 (doi: 10.1053/tvjl.1999.0450).
4. Lucy M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *Journal of Dairy Science*, 2001, 84(6): 1277-1293 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70158-0).
5. Kropp J., Pecagaricano F., Salih S.M., Khatib H. Invited review: Genetic contributions underlying the development of preimplantation bovine embryos. *Journal of Dairy Science*, 2014, 97(3): 1187-1201 (doi: 10.3168/jds.2013-7244).
6. Hyun-Joo L., Ho-Beak Y., Harim I., Jihoo P., Yong-il C., Yeon-Seop J., Kwang-Seok K., Seok-Ki I. Survey on the incidence of reproductive disorders in dairy cattle. *Journal of Embryo Transfer*, 2015, 30(1): 59-64 (doi: 10.12750/JET.2015.30.1.59).
7. Fessenden B., Weigel D.J., Osterstock J., Galligan D.T., Di Croce F. Validation of genomic predictions for a lifetime merit selection index for the US dairy industry. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(11): 10414-10428 (doi: 10.3168/jds.2020-18502).
8. Randel R.D., Welsh T.H. Jr. Joint alpha-rumen species symposium: interactions of feed efficiency with beef heifer reproduction development. *Journal of Animal Science*, 2013, 91(3): 1323-1328 (doi: 10.2527/jas.2012-5679).
9. Ribeiro E.S., Galvão K.N., Thatcher W.W., Santos J.E.P. Economic aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. *Animal Reproduction*, 2012, 9(3): 370-387.
10. Perkel K.J., Tscherner A., Merrill C., Lamarre J., Madan P. The ART of selecting the best embryo: a review of early embryonic mortality and bovine embryo viability assessment methods. *Molecular Reproduction Development*, 2015, 82(11): 822-838 (doi: 10.1002/mrd.22525).
11. Diskin M.G., Sreenan J.M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *Journal Reproduction Fertility*, 1980, 59: 463-468 (doi: 10.1530/jrf.0.0590463).
12. Humblot P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology*, 2001, 56(9): 1417-1433 (doi: 10.1016/s0093-691x(01)00644-6).
13. Wathes D.C. Embryonic mortality and the uterine environment. *Journal of Endocrinology*, 1992, 134(3): 321-325 (doi: 10.1677/joe.0.1340321).
14. Reese S.T., Pereira M.C., Vasconcelos J.L.M., Smith M.F., Geary T.V., Peres R.F.G., Perry G.A., Pohler K.G. Markers of pregnancy: how early can we detect pregnancies in cattle using pregnancy-associated (PAGs) and microRNAs? *Animal Reproduction*, 2016, 13(3): 200-208 (doi: 10.21451/1984-3143-AR878).
15. Rani P., Dutt R., Singh G., Chandolia R.R. Embryonic mortality in cattle — a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2018, 7(7): 1501-1516 (doi: 10.20546/ijcmas.2018.707.177).
16. Peippo J., Machaty Z., Peter A. Terminologies for the pre-attachment bovine embryo. *Theriogenology*, 2011, 76(8): 1373-1379 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.06.018).
17. Zolini A.M., Block J., Rabaglino M.B., Rincon G., Hoelker M., Bromfield J.J., Salilew-Wondim D., Hansen P.J. Genes associated with survival of female bovine blastocysts produced in vivo. *Cell and Tissue Research*, 2020, 382: 665-678 (doi: 10.1007/s00441-020-03257-y).
18. Bovine reproduction. In: *Compendium of animal reproduction*. M. Ptaszynska (ed.). Intervet International BV, 2009.
19. Khatib H., Huang, W., Wang X., Tran, A H., Bindrim A.B., Schutzkus V., Monson R.L., Yandell B.S. Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(5): 2238-2247 (doi: 10.3168/jds.2008-1767).
20. Santos J.E.P., Thatcher W.W., Chebel R.C., Cerri R.L.A., Galvão K.N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science*, 2004, 82-83: 513-535 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.015).
21. Watson A.J., Westhusin M.E., Winger Q.A. IGF paracrine and autocrine interactions between conceptus and oviduct. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1999, 54: 303-315.
22. Avilés M., Coy P., Rizos D. The oviduct: a key organ for the success of early reproductive events. *Animal Frontiers*, 2015, 5(1): 25-31 (doi: 10.2527/af.2015-0005).
23. Rizos D., Maillou V., Lonergan P. Role of the oviduct and oviduct-derived products in ruminant embryo development. *Animal Reproduction*, 2016, 13(3): 160-167 (doi: 10.21451/1984-3143-AR863).

24. Forde N., Spencer T.E., Bazer F.W., Song G., Roche J.F., Lonergan P. Effect of pregnancy and progesterone concentration on expression of genes encoding for transporters or secreted proteins in the bovine endometrium. *Physiological Genomics*, 2010, 41(1): 53-62 (doi: 10.1152/physiolgenomics.00162.2009).
25. Talukder A.K., Marey M.A., Shirasuna K., Kusama K., Shimada M., Imakawa K., Miyamoto A. Roadmap to pregnancy in the first 7 days post-insemination in the cow: Immune crosstalk in the corpus luteum, oviduct, and uterus. *Theriogenology*, 2020, 150: 313-320 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.01.071).
26. Kues W.A., Sudheer S., Herrmann D., Carnwath J. W., Havlicek V., Besenfelder U., Lehrach H., Adjaye J., Niemann H. Genome-wide expression profiling reveals distinct clusters of transcriptional regulation during bovine preimplantation development in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(50): 19768-19773 (doi: 10.1073/pnas.0805616105).
27. Zolini A.M., Block J., Rabaglino M.B., Tribulo P., Hoelker M., Rincon G., Bromfield J.J., Hansen P.J. Molecular fingerprint of female bovine embryos produced in vitro with high competence to establish and maintain pregnancy. *Biology of Reproduction*, 2020, 102(2): 292-305 (doi: 10.1093/biolre/ioz190).
28. Ledoux D., Ponsart C., Grimard B., Gatién J., Deloche M.C., Fritz S., Lefebvre R., Humblot P. Sire effect on early and late embryonic death in French Holstein cattle. *Animal*, 2015, 9(5): 766-774 (doi: 10.1017/S1751731114003140).
29. Hansen P.J., Block J., Loureiro B., Bonilla L., Hendricks K.E.M. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro-produced embryos for post-transfer survival in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 2010, 22(1): 59-66 (doi: 10.1071/RD09212).
30. Trasler J.M., Hales B.F., Robaire B. Paternal cyclophosphamide treatment of rats causes fetal loss and malformations without affecting male fertility. *Nature*, 1985, 316(6024): 144-146 (doi: 10.1038/316144a0).
31. Kumaresan A., Gupta M.D., Datta T.K., Morrell J.M. Sperm DNA integrity and male fertility in farm animals: a review. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 321 (doi: 10.3389/fvets.2020.00321).
32. Church R.B., Shea B.F. The role of embryo transfer in cattle improvement programs. *Canadian Journal of Animal Science*, 1977, 57(1): 33 (doi: 10.4141/cjas77-005).
33. Hasler J.F. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 2014, 81(1): 152-169 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.010).
34. Thomasen J.R., Willam A., Egger-Danner C., Sørensen A.C. Reproductive technologies combine well with genomic selection in dairy breeding programs. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(2): 1331-1340 (doi: 10.3168/jds.2015-9437).
35. Camargo L.S.A., Viana J.H.M., Sá W.F., Ferreira A.M., Ramos A.A., Vale Filho V.R. Factors influencing in vitro embryo production. *Animal Reproduction*, 2006, 3(1): 19-28.
36. Patel D., Haque N., Patel G., Chaudhari A., Madhavatar M., Bhalakiya N., Jamnesha N., Patel P. Implication of embryo transfer technology in livestock productivity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2018, 7: 1498-1510.
37. Sirard M.-A. 40 years of bovine IVF in the new genomic selection context. *Reproduction*, 2018, 156(1): R1-R7 (doi: 10.1530/REP-18-0008).
38. Viana J. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, 2020, 38(4): 7-26.
39. Lonergan P., Fair T., Forde N., Rizos D. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, 2016, 86(1): 270-277 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.040).
40. Petroman I., Pacala N., Petroman C. Utilization of gestagen hormones and pituitary FSH extracts in inducing the superovulation at embryo donor cows. *Journal of Food Agriculture & Environment*, 2009, 7(2): 193-195.
41. Desaulniers D.M., Lussier J.G., Gaff A.K., Bousquet D., Guilbault L.A. Follicular development and reproductive endocrinology during and after superovulation in heifers and mature cows displaying contrasting superovulatory responses. *Theriogenology*, 1995, 44(4): 479-497 (doi: 10.1016/0093-691X(95)00220-3).
42. Bó G.A., Mapletoft R.J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 2014, 81(1): 38-48 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.09.020).
43. Naranjo-Chacón F., Montiel-Palacios F., Canseco-Sedano R., Ahuja-Aguirre C. Embryo production in middle-aged and mature *Bos taurus* × *Bos indicus* cows induced to multiple ovulation in a tropical environment. *Tropical Animal Health and Production*, 2019, 51: 2641-2644 (doi: 10.1007/s11250-019-01975-2).
44. Wohlres-Viana S., Arashiro E.K.N., Minare T.P., Fernandes C.A.C., Grazia J.G.V., Siqueira L.G.B., Machado M.A., Viana J.H.M. Differential expression of *LHCGR* and its isoforms is associated to the variability in superovulation responses of Gir cattle. *Theriogenology*, 2019, 26: 68-74 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.12.004).
45. Bekele T., Mekuriaw E., Walelegn B. Bovine embryo transfer and its application: arwiew. *Journal of Health, Medicine and Nursing*, 2016, 26: 48-60.

46. Brigida A., Skachkova O., Bykova O., Sorokin V. Comparative evaluation of the efficiency of poliovulation induction in donor cows using “FSH-super” drug with various injection schemes. *Atlantis Press*, 2019, 167: 491-497 (doi: 10.2991/ispc-19.2019.110).
47. Cirit Ü., Özmen M.F., Küçükaslan İ., Köse M., Kutsal H.G., Çınar E.M. Effect of the interval from follicle aspiration to initiation of lengthened FSH treatment on follicular superstimulatory and superovulatory responses and embryo production in lactating Simmental cows. *Theriogenology*, 2019, 128: 218-224 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.02.008).
48. Hackett A.J., Durnford R., Mapletoft R.J., Marcus G.J. Location and status of embryos in the genital tract of superovulated cows 4 to 6 days after insemination. *Theriogenology*, 1993, 40(6): 1147-1153 (doi: 10.1016/0093-691X(93)90285-D).
49. Seidel G.E., Elsen R.E. Embryo transfer in dairy cattle. Hoards Dairyman, 1989.
50. Spencer T.E., Forde N., Dorniak P., Hansen T.R., Romero J.J., Lonergan P. Conceptus derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. *Reproduction*, 2013, 146(4): 377-387 (doi: 10.1530/REP-13-0165).
51. Binelli M., Scolari S.C., Pugliesi G., Hoeck V., Gonella-Diaza A.M., Andrade S.C.S., Gasparin G.R., Coutinho L.L. The transcriptome signature of the receptive bovine uterus determined at early gestation. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0122874 (doi: 10.1371/journal.pone.0122874).
52. Hsieh-Li H.M., Witte D.P., Weinstein M., Branford W., Li H., Small K., Potter S.S. Hoxa 11 structure, extensive antisense transcription, and function in male and female fertility. *Development*, 1995, 121(5): 1373-1385.
53. Kwon H.E., Taylor H.S. The role of *HOX* genes in human implantation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004, 1034 (1): 1-18 (doi: 10.1196/annals.1335.001).
54. Spell A.R., Beal W.E., Corah L.R., Lamb G.C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, 2001, 56(2): 287-297 (doi: 10.1016/s0093-691x(01)00563-5).
55. Sartori R., Suárez-Fernández C.A., Monson R.L., Guenther J.N., Rosa G.J.M., Wiltbank M.C. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*, 2003, 60(7): 1319-1330 (doi: 10.1016/s0093-691x(03)00147-x).
56. Bó G.A., Mapletoft R.J. Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal Reproduction*, 2013, 10(3): 344-348.
57. Mapletoft R.J., Bo G.A. Bovine embryo transfer. In: *Reviews in veterinary medicine*. I. Revah (ed.). International Veterinary Information Service, 2016.
58. Castro Neto A.S., Sanches B.V., Binelli M., Seneda M.M., Perri S.H., Garcia J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing author links open overlay panel. *Theriogenology*, 2005, 63(5): 1249-1255 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.03.022).
59. Quinton H. *Commercial embryo transfer activity in Europe 2020*. Association of embryo technology in Europe, 2020. Available: <https://www.aete.eu/publications/statistics/>. No date.
60. Baruselli P.S., Souza A.H., Sá Filho M.F., Marques M.O., Sousa Sales J.N. Genetic market in cattle (Bull, AI, FTAI, MOET and IVP): financial payback based on reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. *Animal Reproduction*, 2018, 15(3): 247-255 (doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0091).
61. Smith A.K., Grimmer S.P. Pregnancy rates for Grade 2 embryos following administration of synthetic GnRH at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology*, 2002, 57(8): 2083-2091 (doi: 10.1016/s0093-691x(02)00704-5).
62. Dochi O., Yamamoto Y., Saga H., Yoshida N., Kano N., Maeda J., Miyata K., Yamauchi A., Tominaga K., Oda Y., Nakashima T., Inohae S. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on-farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*, 1998, 49(5): 1051-1058 (doi: 10.1016/s0093-691x(98)00053-3).
63. Vasconcelos J.L.M., Jardina D.T.G., Sá Filho O.G., Aragon F.L., Veras M.B. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin-releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 2011, 75(6): 1153-1160 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.11.027).
64. Galli C. Achievements and unmet promises of assisted reproduction technologies in large animals: a personal perspective. *Animal Reproduction*, 2017, 14(3): 614-621 (doi: 10.21451/1984-3143-AR1005).
65. Erdem H., Karasahin T., Alkan H., Dursun S., Satilmis F., Guler M. Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. *Tropical Animal Health and Production*, 2020, 52: 2541-2547 (doi: 10.1007/s11250-020-02287-6).
66. Guemra S., Santo E., Zanin R., Monzani P.S., Sovernigo T.C., Ohashi O.M., Leal C.L.V., Adona P.R. Effect of temporary meiosis block during prematuration of bovine cumulus—oocyte complexes on pregnancy rates in a commercial setting for in vitro embryo production. *Theriogenology*, 2014, 81(7): 982-987 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.026).

67. Humblot P., Bourhis D.L., Fritz S., Colleau J.J., Gonzalez C., Joly C.G., Malafosse A., Heyman Y., Amigues Y., Tissier M., Ponsart C. Reproductive technologies and genomic selection in cattle. *Veterinary Medicine International*, 2010: 192787 (doi: 10.4061/2010/192787).
68. Varga E., Kiss R., Papp A.B. In vitro maturation of porcine, bovine and equine oocytes. Literature review. *Magyar Allatorvosok Lapja*, 2008, 130(9): 542-549.
69. Sirard M.-A., Richard F., Blondin P., Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 2006, 65(1): 126-136 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.020).
70. Soto-Heras S., Paramio M.T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. *Research in Veterinary Science*, 2020, 132: 342-350 (doi: 10.1016/j.rvsc.2020.07.013).
71. Cagnone G., Sirard M.-A. The embryonic stress response to in vitro culture: insight from genomic analysis. *Reproduction*, 2016, 152(6): 247-261 (doi: 10.1530/REP-16-0391).
72. El-Sayed A., Hoelker M., Rings, F., Salilew D., Jennen D., Tholen E., Sirard M.A., Schellander K., Tesfaye D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiological Genomics*, 2006, 28(1): 84-96 (doi: 10.1152/physiolgenomics.00111.2006).
73. Summers M.C., Biggers J.D. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Human Reproduction Update*, 2003, 9(6): 557-582 (doi: 10.1093/humupd/dmg039).
74. Farin P.W., Farin C.E. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: Survival and fetal development. *Biology of Reproduction*, 1995, 52(3): 676-682 (doi: 10.1095/biolreprod52.3.676).
75. Blondin P., Coenen K., Guilbault L.A., Sirard M.-A. In vitro production of bovine embryos: Developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*, 1997, 47(5): 1061-1075 (doi: 10.1016/S0093-691X(97)00063-0).
76. Lonergan P., Fair T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology*, 2008, 69(1): 17-22 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.09.007).
77. Lonergan P., Forde N. Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. *Animal*, 2014, 8(1): 64-69 (doi: 10.1017/S1751731114000470).
78. Suwik K., Boruszewska D., Sinderewicz E., Kowalczyk-Zieba I., Staszkieicz-Chodor J., Woclawek-Potocka I. Expression profile of developmental competence gene markers in comparison with prostaglandin F_{2a} synthesis and action in the early- and late-cleaved pre-implantation bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 2021, 56(3): 437-447 (doi: 10.1111/rda.13880).
79. Rizos D., Clemente M., Bermejo-Alvarez P., Fuente J., Lonergan P., Gutiérrez-Adán A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 2008, 43(s4): 44-50 (doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x).
80. Sanches B.V., Zangirolamo A.F., Seneda M.M. Intensive use of IVF by large-scale dairy programs. *Animal Reproduction*, 2019, 16(3): 394-401 (doi: 10.21451/1984-3143-AR2019-0058).
81. Aguila L., Treulen F., Therrien J., Felmer R., Valdivia M., Smith L.C. Oocyte selection for in vitro embryo production in bovine species: noninvasive approaches for new challenges of oocyte competence. *Animals*, 2020, 10(12): 2196 (doi: 10.3390/ani10122196).
82. Ealy A.D., Wooldridge L.K., McCoski S.R. Post-transfer consequences of in vitro-produced embryos in cattle. *Journal of Animal Science*, 2019, 97(6): 2555-2568 (doi: 10.1093/jas/skz116).
83. Pollard J.W., Leibo S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*, 1994, 41(1): 101-106 (doi: 10.1016/S0093-691X(05)80054-8).
84. Rizos D., Ward F., Duffy P., Boland M.P., Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction Development*, 2002, 61(2): 234-248 (doi: 10.1002/mrd.1153).
85. Canon-Beltran K., Giraldo-Giraldo J., Cajas Y.N., Beltrán-Breña P., Hidalgo C.O., Vásquez N., Leal C.L.V., Gutiérrez-Adán A., González E.M., Rizos D. Inhibiting diacylglycerol acyltransferase-1 reduces lipid biosynthesis in bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, 2020, 158: 267-276 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2020.09.014).
86. Sanches B.V., Lunardelli P.A., Tannura J.H., Cardoso B.L., Pereira M.H.C., Gaitkoski G., Basso A.C., Arnold D.R., Seneda M.M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF embryos. *Theriogenology*, 2016, 85(6): 1147-1151 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.11.029).
87. Wakchaure R., Ganguly S. Twinning in cattle: a review. *ARC Journal of Gynecology and Obstetrics*, 2016, 1(4): 1-3 (doi: 10.20431/2456-0561.0104001).
88. Winchester C.F. Monozygotic twin beef cattle in nutrition research. *Science*, 1952, 116(3002): 3.
89. Ozil J.P. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1983, 69(2): 463-468 (doi: 10.1530/jrf.0.0690463).
90. Williams T.J., Elsdon R.P., Seidel G.E. Jr. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology*, 1984, 22(5): 521-531 (doi: 10.1016/0093-691x(84)90051-7).
91. Warfield S.J., Seidel G.E. Jr., Elsdon R.P. Transfer of bovine demi-embryos with and without the zone pellucid. *Journal of Animal Science*, 1987, 65(3): 756-761 (doi: 10.2527/jas1987.653756x).

92. Matsumoto K., Miyake M., Utumi K., Iritani A. Bisection of rat, goat and cattle blastocysts by metal blade. *The Japanese Journal of Animal Reproduction*, 1987, 33(1): 1-5 (doi: 10.1262/jrd1977.33.1).
93. Ozil J.P., Heyman Y., Renard J.P. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. *Vet Rec.*, 1982, 110(6): 126-127 (doi: 10.1136/vr.110.6.126).
94. Skrzyszowska, M., Smorąg, Z., Kańska, L. Demi-embryo production from hatching of zona-drilled bovine and rabbit blastocysts. *Theriogenology*, 1997, 48(4): 551-557 (doi: 10.1016/s0093-691x(97)00272-0).
95. Silva J.C.E., Diniz P., Costa L.L. Luteotrophic effect, growth and survival of whole versus half embryos and, their relationship with plasma progesterone concentrations of recipient dairy heifers. *Animal Reproduction Science*, 2008, 104(1): 18-27 (doi: 10.1016/j.anireprosci.2007.01.004).
96. Iturbide A., Torres-Padilla M.-E. A cell in hand is worth two in the embryo: recent advances in 2-cell like cell reprogramming. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2020, 64: 26-30 (doi: 10.1016/j.gde.2020.05.038).
97. Bredbacka P., Jaakma U., Muursepp I. Production of calves following nonsurgical transfer of fresh and refrigerated bovine demi-embryos. *Agricultural and Food Science in Finland*, 1996, 5(5): 521-527 (doi: 10.23986/afsci.72764).
98. Saito S., Niemann H. In vitro and in vivo survival of bovine demi-embryos following simplified bisection and transfer of one or two halves per recipient. *Journal of Reproduction Development*, 1993, 39(3): 251-258 (doi: 10.1262/jrd.39.251).
99. Hashiyada Y. The contribution of efficient production of monozygotic twins to beef cattle breeding. *Journal of Reproduction and Development*, 2017, 63(6): 527-538 (doi: 10.1262/jrd.2017-096).
100. Lopatarova M., Cech S., Krantorad P., Holy L., Hlavicek J., Dolezel R. Sex determination in bisected bovine embryos and conception rate after the transfer of female demi-embryos. *Veterinarni medicina*, 2008, 53(11): 595-603 (doi: 10.17221/1864-VETMED).
101. Skrzyszowska M., Smorąg Z. Cell loss in bisected mouse, sheep and cow embryos. *Theriogenology*, 1989, 32: 115-122 (doi: 10.1016/0093-691x(89)90527-x).
102. Casser E., Israel S., Boiani M. Multiplying embryos: experimental monozygotic polyembryony in mammals and its uses. *The International Journal Developmental Biology*, 2019, 63: 143-155 (doi: 10.1387/ijdb.190016mb).
103. Gladchuk I.Z., Doshchechkin V.V. Subfertility: philosophy and methodology of the problem. Part II. *Reproductive Endocrinology*, 2018, 42: 8-15 (doi: 10.18370/2309-4117.2018.42.8-15).
104. Sontag L.B., Lorincz M.C., Georg Luebeck E. Dynamics, stability and inheritance of somatic DNA methylation imprints. *Journal of Theoretical Biology*, 2006, 242(4): 890-899 (doi: 10.1016/j.jtbi.2006.05.012).
105. Weber W. Populations and genetic polymorphisms. *Molecular Diagnosis*, 1999, 4(4): 299-307 (doi: 10.1016/S1084-8592(99)80006-X).
106. Salehi R., Tsoi S.C.M., Colazo M.G., Ambrose D.J., Robert C., Dyck M.K. Transcriptome profiling of in-vivo produced bovine pre-implantation embryos using two-color microarray platform. *Developmental Biology*, 2017, 119: e53754 (doi: 10.3791/53754).
107. Van Hoeck V., Rizos D., Gutierrez-Adan A., Pintelon I., Jorssen E., Dufort I., Sirard M.A., Verlaet A., Hermans N., Bols P.E.J., Leroy J.L.M.R. Interaction between differential gene expression profile and phenotype in bovine blastocysts originating from oocytes exposed to elevated non-esterified fatty acid concentrations. *Reproduction, Fertility and Development*, 2015, 27(2): 372-384 (doi: 10.1071/RD13263).
108. Lee K.-F., Chow J.F.C., Xu J.S., Chan S.T.H., Ip S.M., Yeung W.S.B., Notes A. A comparative study of gene expression in murine embryos developed in vivo, cultured in vitro, and cocultured with human oviductal cells using messenger ribonucleic acid differential display. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(3): 910-917 (doi: 10.1095/biolreprod64.3.910).
109. Jones G.M., Cram D.S., Song B., Kokkali G., Pantos K., Trounson A.O. Novel strategy with potential to identify developmentally competent IVF blastocysts. *Human Reproduction*, 2008, 23(8): 1748-1759 (doi: 10.1093/humrep/den123).
110. Allis C.D., Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, 2016, 17: 487-500 (doi: 10.1038/nrg.2016.59).
111. Wu C., Sirard M.-A. Parental effects on epigenetic programming in gametes and embryos of dairy cows. *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 557846 (doi: 10.3389/fgene.2020.557846).
112. Laskowski D., Humblot P., Sirard M.A., Sjunnesson Y., Jhamat N., Båge R., Andersson G. DNA methylation pattern of bovine blastocysts associated with hyperinsulinemia in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 2018, 85(7): 599-611 (doi: 10.1002/mrd.22995).
113. Wrenzycki C., Herrmann D., Lucas-Hahn A., Korsawe K., Lemme E., Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reproduction, Fertility and Development*, 2005, 17(2): 23-35 (doi: 10.1071/rd04109).
114. Bressan F.F., De Bem T.H.C., Perecin F., Lopes F.L., Ambrosio C.E., Meirelles F.V., Miglino M.A. Unearthing the roles of imprinted genes in the placenta. *Placenta*, 2009; 30(10): 823-834 (doi: 10.1016/j.placenta.2009.07.007).

115. Baroux C., Autran D., Gillmor C.S., Grimanelli D., Grossniklaus U. The maternal to zygotic transition in animals and plants. *Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology*, 2008, 73: 89-100 (doi: 10.1101/sqb.2008.73.053).
116. Dobbs K.B., Rodriguez M., Sudano M.J., Ortega M.S., Hansen P.J. Dynamics of DNA methylation during early development of the preimplantation bovine embryo. *PLoS ONE*, 2013, 8: 66230 (doi: 10.1371/journal.pone.0066230).
117. McKiernan S.H., Bavister B.D. Fertilization and early embryology: Timing of development is a critical parameter for predicting successful embryogenesis. *Human Reproduction*, 1994, 9(11): 2123-2129 (doi: 10.1093/oxfordjournals.humrep.a138403).
118. Soom A., Ysebaert M.T., Kruif A. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophectoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 1997, 47(1): 47-56 (doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<47::AID-MRD7>3.0.CO;2-Q).
119. Gad A., Hoelker M., Besenfelder U., Havlicek V., Cinar U., Rings F., Held E., Dufort I., Sirard M.-A., Schellander K., Tesfaye D. Molecular mechanisms and pathways involved in bovine embryonic genome activation and their regulation by alternative in vivo and in vitro culture conditions. *Biology of Reproduction*, 2012, 87(4): 1-13 (doi: 10.1095/biolreprod.112.099697).
120. Humblot P. From clinics to (cow) mics: a reproductive journey. *Anim. Reprod.*, 2018, 15(3): 278-291 (doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0076).
121. Wiggans G.R., Cole J.B., Hubbard S.M., Sonstegard T.S. Genomic selection in dairy cattle: the USDA experience. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2017, 5: 309-327 (doi: 10.1146/annurev-animal-021815-111422).
122. McDaniel B.T., Cassell B.G. Effects of embryo transfer on genetic change in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 1981, 64(12): 2484-2492 (doi: 10.3168/jds.S0022-0302(81)82873-1).
123. Mäntysaari E.A., Koivula M., Strandén I. Symposium review: Single-step genomic evaluations in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(6): 5314-5326 (doi: 10.3168/jds.2019-17754).
124. Hayes B.J., Bowman P.J., Chamberlain A.J., Goddard M.E. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. *Journal of Dairy Science*, 2009, 92(2): 433-443 (doi: 10.3168/jds.2008-1646).
125. Hu Z.-L., Park C.A., Reecy J.M. Building a livestock genetic and genomic information knowledgebase through integrative developments of Animal QTLdb and CorrDB. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(D1): D701-D710 (doi: 10.1093/nar/gky1084).
126. Robert C., Nieminen J., Dufort I., Gagné D., Grant J.R., Cagnone G., Plourde D., Nivet A.L., Fournier É., Paquet É., Blazejczyk M., Rigault P., Juge N., Sirard M.A. Combining resources to obtain a comprehensive survey of the bovine embryo transcriptome through deep sequencing and microarrays. *Molecular Reproduction & Development*, 2011, 78: 651-664 (doi: 10.1002/mrd.21364).
127. Lund M.S., de Roos A.P., de Vries A.G., Druet T., Ducrocq V., Fritz S., Guillaume F., Guidbrandtsen B., Liu Z., Reents R., Schrooten C., Seefried F., Su G. A common reference population from four European Holstein populations increases reliability of genomic predictions. *Genetics Selection Evolution*, 2011, 43(43) (doi: 10.1186/1297-9686-43-43).
128. Chesnais J.P., Cooper T.A., Wiggans G.R., Sargolzaei M., Pryce J.E., Miglior F. Using genomics to enhance selection of novel traits in North American dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(3): 2413-2427 (doi: 10.3168/jds.2015-9970).