УДК 636.47.082:57.086.13

МЕТЛИЦЬКА О.І., ЩЕРБАК О.В., КОВТУН С.І., ТРОЦЬКИЙ П.А., ЗЮЗЮН А.Б., ОСИПЧУК О.С.

Інститут розведення і генетики тварин НААН,
Україна, 08321, Київська обл., Бориспільський р-н., с. Чубинське, вул. Погребняка, 1,
e-mail: ov19792006@yandex.ru

ОПТИМІЗАЦІЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ПІДХОДІВ У СИСТЕМІ ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ СВИНЕЙ МИРГОРОДСЬКОЇ ПОРОДИ

Наразі ведення галузі свинарства спрямовано на збільшення м'ясної продуктивності, скоростиглості та зниження конверсії корму за високих показників репродуктивної здатності тварин. Такі вимоги ринку ставлять під загрозу існування місцевих порід, які на даний час є неконкурентоспроможними внаслідок недостатньої пристосованості до умов інтенсивних промислових технологій, проте характеризуються унікальними адаптаційними властивостями, якістю м'ясної продукції і специфічністю генофонду. Збереження автохтонних порід у вигляді закритих популяцій обмеженої чисельності *in situ* та *ex situ* призводить до загрози виникнення інбредної депресії тварин внаслідок накопичення генетичного вантажу та зниження рівня загальної генетичної гетерогенності. За таких обставин унеможливлюється збереження унікального генофонду порід методами традиційної селекції. Розробка та практичне застосування сучасних молекулярно-генетичних та біотехнологічних підходів є одним із можливих шляхів підтримки біорізноманіття сільськогосподарських тварин на рівні, необхідному для їх відтворення та запобігання загрози повного зникнення.

В Україні наразі налічується шість порід свиней місцевої селекції: миргородська, українська степова біла, українська степова ряба, полтавська м'ясна, українська м'ясна та червона білопоясна. Однією із характерних автохтонних порід свиней України є миргородська, яку згідно «Програми збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року» віднесено до вітчизняного генофондового об'єкту, який перебуває на межі зникнення [1]. Дана порода свиней також занесена ФАО до унікальних зникаючих генотипів. За адаптивністю до місцевих умов утримання та високими технологічними характеристиками м'язової тканини (наявність жирових прошарків між м'язами, вологоутримувальна здатність м'яса після забою) її можна віднести до порід з унікальними генетичними властивостями [2, 3].

Статистика свідчить, що кількість завезених тварин імпортних генотипів за останні роки зросла у 8,6 разів, а поголів'я українських порід скоротилось у 1,45 разів. Станом на 01 січня 2013 року миргородська порода свиней, згідно «Держплемреєстру» розводиться лише в двох господарствах України: ДП «ДГ ім. Декабристів» Полтавської області (2542 голови) і СВК АФ «Перше травня» Сумської області (879 голів). Кількість основних свиноматок загалом по миргородській породі становить 383 голови, що є критичним показником щодо її подальшого чистопородного розведення.

Миргородську породу виведено шляхом складного відтворного схрещування місцевих українських чорно-рябих свиней із тваринами беркширської, середньої білої та темворської порід, в окремих випадках використовувалося прилиття крові польсько-китайської породи та елементи гібридизації тварин миргородської та великої білої порід за подальшого поглинального схрещування і розведення помісних свиней «у собі». Ця порода формувалася в жорстких умовах утримання й годівлі, в результаті чого було отримано невибагливих швидкостиглих тварин з високим рівнем резистентності та стійкості до стресових факторів. У 1940 р. масив миргородських свиней був затверджений як нова порода [4]. У системі схрещування, гібридизації та створення нових порід миргородську використовують як материнську форму [5, 6].

Ініціатором створення низькотем-пературного генетичного банку статевих і соматичних клітин та зигот був Б.М. Вепрінцев. Учений запропонував поєднання прийомів кріоконсервації з методами біології розвитку [7]. При збереженні генофонду тварин, які знаходяться на межі зникнення, привертає особливу увагу метод кріоконсервації яйцеклітин, дозрілих до стадії метафази II мейозу [8].

Наразі держави, які є членами ФАО, об'єднують свої зусилля для збереження цінних генетичних ресурсів та забезпечення їх раціонального використання [9]. У деяких країнах вже діють програми по збереженню генетичних ресурсів тварин: Canadian Animal Genetic Resources Program (CAGRP) в Канаді, «Node» в Голандії та ін. В Інституті розведення і генетики тварин НААН розпочата робота із збереження зникаючих автохтонних порід свиней із застосування сучасних біотехнологічних та генетичних підходів. Такі технології, як кріоконсервація ооцитів, сперми та ембріонів, забезпечують можливість відновити необхідні види тварин та дозволяє реалізувати завдання щодо накопичення генетичного матеріалу з метою його довгострокового збереження [8, 10]. Створення ооцитобанку забезпечує накопичення необмеженої кількості генетичного матеріалу від різних особин, який є придатним для подальшого використання.

Метою нашої роботи було створення кріоколекції життєздатних ооцитів миргородської породи свиней, визначення оптимальних параметрів преаналітичної обробки біопроб із тканин яєчників свиней для поповнення банку ДНК як основи науково обґрунтованих біотехнологічних підходів щодо збереження свиней зникаючих порід.

Матеріали і методи

Дослідження були виконані в лабораторії біотехнології Інституту розведення і генетики тварин НААН. В експериментах використано яєчники свиней без патологічних ознак. Яєчники відбирали в ДП «ДГ «ім. Декабристів» від забитих племінних свиноматок миргородської породи. Ооцит-кумулюсні комплекси (ОКК) вилучали шляхом надрізу лезом видимих антральних фолікулів. Непридатні до культивування ОКК та яєчники було заморожено для проведення молекулярно-генетичних досліджень. Повноцінні ОКК розмістили на дозрівання *in vitro* в середовище Ерла 199 (Sigma) з додаванням 20 % еструсної сироватки крові корів і 3–5 х 10^6 клітин гранульози/мл. Для культивування поза організмом відбирали лише ОКК із щільним та розпушеним кумулюсом та без ознак дегенерації ооплазми. Гамети культивували упродовж 46 годин при +38,8 °С і 5 % CO_2 у повітрі. Критерієм морфологічної оцінки повноцінності дозрівання ооцитів була наявність першого полярного тільця. Перед кріокосервацією такі ооцити обробляли 10 хв. еквілібраційним розчином (10 % гліцерин + 20 % пропандіол) та переносили у вітрифікаційний розчин (25 % гліцерин + 25 % пропандіол). Еквілібраційний та вітрифікаційний розчини були приготовлені на фосфатно-сольовому буфері Дюльбеко з додаванням 20 % сироватки корів, яку попередньо інактивували при +56 °С протягом 30 хв.

Свіжовилучені та заморожені (за –20 °С) біоптати ОКК, які є непридатними для проведення біотехнологічних досліджень, та паренхімної тканини яєчників свиноматок використовували для виділення ДНК свиней. Подрібнення зразків тканин яєчників та ОКК проводили за допомогою скляного гомогенізатора, заморожених біоптатів – шляхом розтирання зразків тканин у лабораторній ступці з додаванням дрібних частинок скла. По 2 мг гомогенату тканин від кожної проби використовували для проведення процедури екстракції ДНК.

Виділення ДНК із біопсійного матеріалу проводили згідно з методикою, що зводить до мінімуму вірогідність деградації ДНК – сольовим методом [11] за використання ацетату калію. Нативність ДНК визначали шляхом електрофорезу в 1 % агарозному гелі за відсутності «шмерів» фрагментів ДНК, РНК та інтенсивності флуоресценції ДНК, забарвленої бромистим етидієм при УФ опромінюванні електрофореграм [12, 13] .

Вимірювання концентрації ДНК проводили за допомогою спектрофотометру при довжини хвилі 260 нм, згідно технічних особливостей приладу [12]. Використовували кювети з довжиною оптичного шляху 1 мм та місткістю 200 мкл. Для вимірювання концентрації ДНК вихідний зразок розводили дистильованою водою із розрахунку 1:40. В контрольну кювету наливали 200 мкл дистильованої води, в іншу – приготований зразок ДНК. Проводили вимірювання оптичної щільності зразка при довжині хвилі 260 нм. Розрахунок концентрації ДНК проводили шляхом множення значення оптичної щільності зразка при довжині хвилі 260 нм на коефіцієнт 20.

Контроль чистоти препаратів ДНК проводили розрахунком співвідношення оптичних щільностей розчину ДНК при довжині хвилі 260 нм і 280 нм (OD_{260}/OD_{280}).

Результати та обговорення

Інститут розведення і генетики тварин НААН з 2006 р. координує виконання програми наукових досліджень НААН «Збереження генофонду», завдання якої реалізовують 12

наукових установ системи НААН, а також забезпечує функціонування Банку генетичних ресурсів тварин, віднесеного до наукових об'єктів, що становлять національне надбання (розпорядження Кабінету Міністрів України від 19 серпня 2002 р. № 472-р.). В Банку генетичних ресурсів ІРГТ НААН накопичено понад 132 тис. спермодоз еякульованих сперматозоїдів 27 порід великої рогатої худоби, 26 спермодоз коней двох порід, 1000 спермодоз кнурів двох локальних порід, 28 доз сперми овець двох автохтонних порід. Даний генетичний матеріал використовується не лише з метою довгострокового зберігання, а і для проведення наукових досліджень з оцінки раннього ембріогенезу та ДНК-типування тварин вітчизняних порід. Такі дослідження вимагають наявності великої кількості вихідного біологічного матеріалу, придатного для проведення експериментів. Також в Банку генетичних ресурсів тварин закладено на зберігання сперматозоїди, вилучені із хвостової частини придатків (епідидиміс) сім'яників від бугаїв, кнурів, цапів різних порід і породних груп. Наразі в Інституті розведення і генетики тварин НААН розпочато створення ооцитобанку свиней миргородської породи.

Для вилучення гамет, необхідних для створення кріобанку і проведення досліджень відносно оптимізації преаналітичного етапу обробки біологічного матеріалу для виділення ДНК, було відібрано три свиноматки миргородської породи свиней різного генеалогічного походження.

При плануванні експерименту по вилученню ОКК свиноматок для поповнення Банку генетичних ресурсів тварин спиралися на генеалогічний аналіз стада ДП «ДГ ім. Декабристів», згідно якого найбільшу частку від загальної кількості складають представники провідних родин Сороки, Ласкавої, Сойки та Смородини (17 %, 15 %, 14,5 % та 13,5 %, відповідно). Окрім широкої представленості родин у загальній структурі стада при формуванні групи досліду враховували репродуктивні ознаки свиноматок та наявність рекордисток по породі у обраних генеалогічних структурах.

За даними декількох бонітувань, рекордистками по стаду за останні три роки визнано три свиноматки: Русалка 410, Ласкава 220 і Ласкава 76, а кращими визнано 36 свиноматок, із них найбільша кількість тварин належала родинам Сороки (5 голів), Конвалії, Ласкавої, Сойки та Смородини (по 4 голови з кожної).

В результаті проведеної роботи для довготривалого зберігання в Банк генетичних ресурсів тварин закладено повноцінних дозрілих *in vitro* 25 ооцитів від свиноматки Русалка № 274/05128, 19 ооцитів від свиноматки Сойка № 314 та 53 ооцити від свиноматки Смородина № 674 миргородської породи (табл. 1).

Зазначимо, що при формуванні кріобанку ооцитів необхідно враховувати індивідуальні особливості тварин. Вилучені з яєчників свиноматок миргородської породи ОКК характеризуються значною гетерологічністю популяції ооцитів як за якістю, так і загальною їх кількістю (рис. 1).

За результатами морфологічного аналізу встановлено, що кількість отриманих і придатних для кріоконсервації ОКК від кожної свиноматки може коливатися від 21 до 42 клітин.

Таблиця 1. Кількість вилученого генетичного матеріалу від свиней миргородської породи, придатного до кріоконсервації

Кличка тварини, інд. №	Кількість біоматеріалу для ДНК досліджень		Кількість кріоконсервованих яйцеклітин, n
	тканина яєчників n (мікропробірок)	ооцит-кумулюсні комплекси, n	
Русалка №274/05128	57	25	25
Сойка №314	43	10	19
Смородина №674	39	18	53
Всього	**139**	**53**	**97**

Крім того, з яєчників свиноматки Смородина № 674 74,6 % ОКК були придатними до культивування і досягли метафази II, а у свиноматки Сойка № 314 тільки 65,5 % виявилися придатними для культивування та кріоконсервації і лише 50,0 % ОКК були придатними до подальшого використання із яєчників свиноматки Русалка № 274/05128.

Таким чином, одним із лімітуючих факторів при збереженні генетичних ресурсів свиней є індивідуальна варіабельність у кількості повноцінних життєздатних ооцитів. Така різниця в кількості одержаних яйцеклітин, придатних для кріоконсервації, головним чином пов'язана з віком тварини та стадією статевого циклу на якому вона перебувала у момент вилучення ОКК. Отже, існує необхідність розробки нових та удосконалення існуючих методів вилучення, культивування та прогнозованої оцінки придатності до тривалого збереження ооцитів свиноматок шляхом кріоконсервації, щоб за обмеженої кількості наявного генетичного матеріалу досягти максимально раціонального рівня його використання.

Для проведення ДНК-досліджень використовували біоматеріал із тканини яєчників та незрілих ОКК свиноматок, що був непридатним для подальших маніпуляцій в умовах *in vitro*. Проводили порівняльні дослідження концентрації, якості та нативності виділеної ДНК із свіжоотриманих та заморожених біоптатів. Результати проведених вимірювань наведені в табл. 2.

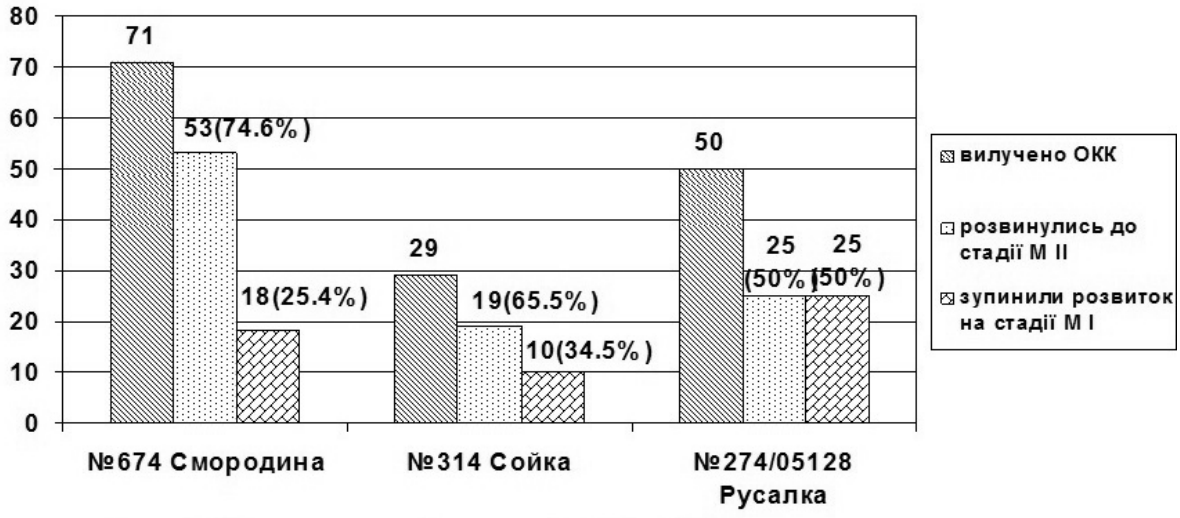

Рис. 1. Рівень дозрівання *in vitro* ОКК свинок миргородської породи

Таблиця 2. Спектрофотометричний аналіз ДНК свиней миргородської породи

№ з/п	Номер тварини, кличка, вид біол. матеріалу	260нм	280нм	260/280	мкг/мкл
1.	Русалка №274/05128 (ОКК)	0,165	0,107	**1,54**	3,30
	Русалка №274/05128 (ОКК), -20 °С	0,178	0,110	1,62	3,56
	Русалка №274/05128 біопт. яєчн.	0,290	0,185	1,57	5,80
	Русалка №274/05128 біопт. яєчн., -20 °С	0,354	0,211	1,68	**7,08**
2.	Сойка №314 (ОКК)	0,153	0,101	**1,51**	**3,05**
	Сойка №314 (ОКК), -20 °С	0,236	0,148	1,59	4,72
	Сойка №314 біопт. яєчн.	0,268	0,164	1,63	5,36
	Сойка №314 біопт. яєчн., -20 °С	0,317	0,548	1,73	6,34
3.	Смородина № 674 (ОКК)	0,219	0,130	1,69	4,37
	Смородина № 674 (ОКК), -20 °С	0,292	0,166	1,76	5,84
	Смородина № 674 біопт. яєчн.	0,307	0,171	1,80	6,13
	Смородина № 674 біопт. яєчн., -20 °С	0,312	0,568	**1,82**	6,23

Після процедури виділення ДНК сольовим методом, концентрація тотальної ДНК складала 3,05–7,08 мкг/мл., що залежало від попередньої температурної обробки (за низьких температур) біоптатів та їх походження (ОКК та паренхіма яєчників). Було показано, що найвищу концентрацію ДНК отримано із зразків паренхіми яєчників, попередньо заморожених протягом доби за температури -20 °С: концентрація ДНК, виділена із біоптатів замороженого яєчника Русалки № 274/05128 сягала найвищого значення – 7,08 мкг/мл, а мінімальна, проте достатня для проведення молекулярно-генетичних досліджень у полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР) із встановлення характерних особливостей генотипу тварини була визначена для ДНК-проби, отриманої із свіжовилученого біоптату ОКК свиноматки Сойка № 314.

Одержані за методикою сольової екстракції проби ДНК мали в цілому високу ступінь чистоти, що підтверджується розрахованими значеннями співвідношень оптичних щільностей зразків, визначених при довжині хвиль 260 та 280 нм, які знаходилися у межах 1,51–1,82. Проведення електрофоретичного аналізу препаратів ДНК показало низьку нативність та ступінь чистоти екстрагованої нуклеїнової кислоти в пробах, отриманих із неохолоджених ОКК свиноматок Русалка № 274/05128 та Сойка № 314, що підтверджується наявністю «шмерів» на електрофореграмах після забарвлення бромистим етидієм як ознак деградації ДНК та домішків РНК. Додатковим показником зниженої придатності зазначених зразків ДНК є величини співвідношень оптичної щільності препаратів при довжіні хвилі 260 та 280 нм, що склали 1,54 та 1,51, відповідно проти 1,9 ± 0,2 як стандарту «чистоти» екстрагованої ДНК.

Концентрація ДНК препаратів у деяких зразках перевищувала оптимальні значення (4–5 мкг/мл) для застосування в локус-специфічній полімеразній ланцюговій реакції, що повинно враховуватись при плануванні молекулярно-генетичного аналізу із застосуванням маркерів різних класів. Наприклад, ДНК-зразок від тварини Русалка № 274/05128 перед проведенням ПЛР-реакції повинен бути розведений бідистильованою водою до вихідної концентрації 5 мкг/мкл для проведення досліджень QTL або STR локусів і надалі у співвідношенні 1:10 для використання у фінгерпринтному аналізі в технологіях ISSR, IRAP, REMAP, AFLP, тощо.

В Україні розведення високопродуктивних зарубіжних порід, типів і ліній, відселекціонованих за м’ясними та відгодівельними якостями, згідно вимог сучасного ринку, призвело до того, що аборигенні і локальні породи свиней знаходяться на межі зникнення, а деякі вже зникли назавжди. Тому необхідність створення Національного кріобанку гамет, зигот та ДНК з біологічного матеріалу сільськогосподарських тварин є надзвичайно актуальним і своєчасним заходом, що є передумовою широкого впровадження у практику методів маркер-асоційованої селекції, комплексної геномної оцінки тварин, генної інженерії на основі біотехнологічних підходів не тільки контексті збереження генофонду порід і біорізноманіття природних ресурсів, але і підвищення ефективності сільськогосподарського виробництва та якості продукції.

Висновки

Застосовано комплекс біотехнологічних та молекулярно-генетичних методів для формування та функціонування ооцитобанку свиней миргородської породи в складі Банку генетичних ресурсів Інституту розведення і генетики тварин НААН. Ооцитобанк поповнено 97-ма повноцінними яйцеклітинами, що дозріли в умовах *in vitro*. Оскільки, миргородську породу віднесено до вітчизняного генофондового об’єкту, створення ооцитобанку є одним з пріоритетних напрямків роботи із збереження та відновлення чисельності тварин зникаючих автохтонних порід у свинарстві, що мають комплекс генів високої адаптивності до місцевих паратипових факторів. Оптимізація та стандартизація преаналітичних та методичних аспектів екстракції нуклеїнових кислот сприятиме одержанню біологічного матеріалу високої якості, придатного до тривалого збереження за низьких температур і подальшого застосування з метою оцінки характерних для порід особливостей генетичної структури, наявності селекційно цінних генних комплексів та генетично детермінованих аномалій розвитку.

Збереження цінного генофондового матеріалу у кріобанках у вигляді гамет сприятиме вирішенню нагальної проблеми відтворення видів, у тому числі і сільськогосподарських тварин, що опинилися на межі зникнення.

Робота виконана під керівництвом д.с.-г.н., член-кор. НААН України С.І. Ковтун.

Література
1. Програма збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року / заг. наук. ред. І.В. Гузєва, консультація та специфікація Ю.В. Мельника. – К.: Арістей, 2009. – 132 с.
2. Бірта Г.О., Бургу Ю.Г. Влияние генотипа на мясные качества свиней // Вісник Полтавської держ. аграр. академії. – 2012. – № 1. – С. 212–214.
3. http://dad.fao.org.
4. Герасимов В.І. та ін. Світовий генофонд свиней: монографі. – Харків: Еспада. – 2006. – 520 с.
5. Ернст Л.К. Генетические основы селекции сельскохозяйственных животных. – М.: РАСХН, ВГНИИ животноводства, 2004. – 736 с.
6. Барановський Д.І. та ін. Генофонд свійських тварин України: навч. посібник. – Харків: Еспада, 2005. – 400 с.
7. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Стратегия сохранения животного и растительного мира земли // Консервация генетических ресурсов. – Пущино, 1991. – С. 47–62.
8. Вепринцев Б.Н., Ротт Н.Н. Консервация генетических ресурсов // Природа. – М., 1978. – № 11. – С. 10–21.
9. FAO Guidelines for the Cryoconservation of Animal Genetic Resources. – Rome, Italy, 2010. – 170 с.
10. Лебедева Я.В. Измерение и оценка биологического разнообразия. – Ростов Н/Д.УПЛ РГУ, 1999.– Ч. 2. – 94 с.
11. Соколов Б.П., Джемелинский В.В. Выделение высокомолекулярной эукариотической ДНК с использованием ацетата калия // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1989. – № 6. – С. 45–46.
12. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. – Москва: Мир, 1984. – 479 с.
13. Медицинские лабораторные технологии. Справочник / [под ред. А.И. Карпищенко]. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. – 2. – 600 с.

METLITSKA O.I., SHCHERBAK O.V., KOVTUN S.I., TROSKIY P.A., ZYUZYN A.B., OSYPCHUK O.S.
Institute of Animal Breeding and Genetics, National Academy of Agrarian Science of Ukraine,
Ukraine, 08321, Kiev Region, Borispol District, v. Chubinske, Pogrebnyaka str., 1, e-mail: ov19792006@yandex.ru

OPTIMIZATION BIOTECHNOLOGICAL METHODS IN THE SYSTEM OF MIRGORODSKA BREED PIGS GENE POOL PRESERVATION

Aims. Gene pool preservation endangered, indigenous pig breeds requires using methods modern biotechnology and genetic. Create a cryocollection Mirgorodska breed pigs viable oocytes and DNA bank for the development of scientific methods of maintenance and further improvement. ***Methods***. In carrying out this work used biotechnology, cryobiological, morphological, molecular genetic methods. ***Results***. As a result of working for long-term storage in the Bank Animal Genetic Resources of the Institute of Animal Breeding and Genetics laid full *in vitro* matured oocytes 25 sows Rysalka № 274/ 05 128, 19 oocytes Sojka № 314 and 53 oocytes Smorodina № 674 Mirgorodska breed pigs. For DNA studies the optimal treatment primary regimes biomaterial: ovarian tissue and immature oocyte cumulus complexes. ***Conclusion.*** Used complex biotechnology and molecular-genetic methods to form oocytebank pigs of Mirgorodska breed in Bank Animal Genetic Resources of the Institute of Animal Breeding and Genetics
Key words: cryobank, oocyte, cryopreservation, DNA-analysis, gene pool.

УДК 604.6:633.15
НІТОВСЬКА І.О. [1], АБРАЇМОВА О.Є. [2], САТАРОВА Т.М. [2], ШАХОВСЬКИЙ А.М. [1], МОРГУН Б.В. [1]
[1] Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: molgen@icbge.org.ua
[2] Державна установа Інститут сільського господарства степової зони НААН України,
Україна, 49600, м. Дніпропетровськ, вул. Дзержинського, 14

БІОЛІСТИЧНА ТРАНСФОРМАЦІЯ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ КУКУРУДЗИ

Генетичну трансформацію рослин сільськогосподарських культур використовують для надання їм певних ознак з метою покращення їх характеристик, збільшення врожаю та здешевлення виробництва. З кожним роком світова площа, зайнята під вирощування