УДК 636.082:591.3:57.086.13 (477)

КОМПЛЕКСНІ БІОТЕХНОЛОГІЇ ДЛЯ РЕАЛІЗАЦІЇ ЗАВДАНЬ ПРОГРАМИ ЗБЕРЕЖЕННЯ ГЕНОФОНДУ СІЛЬСЬКОГОСПОДАРСЬКИХ ТВАРИН В УКРАЇНІ

Рубан С. Ю., д. с.-г. н., Ковтун С. І., д. с.-г. н., Щербак О. В., к. с.-г. н., Бірюкова О. Д., к. с.-г. н.
Інститут розведення і генетики тварин НААН

На основі узагальнення наукового доробку академіка УААН Ф.І. Осташка обґрунтовано прийоми застосування сучасних біотехнологій у системі збереження генетичних ресурсів тварин на клітинному рівні. За використання кріоконсервації еякульованих сперматозоїдів кнурів українських степової білої та степової рябої порід наголошено на необхідності проведення комплексу робіт щодо збереження генетичних ресурсів вітчизняних порід сільськогосподарських тварин, які є носіями унікальних генів.

Ключові слова: **збереження генофонду, сільськогосподарські тварини, кріоконсервація, еякульовані сперматозоїди**

Заслужений діяч науки і техніки України, лауреат Державної премії України, доктор біологічних наук, професор, академік УААН Федір Іванович Осташко є автором сучасної теорії кріоушкодження та кріопротекції біологічних клітин, Харківської технології кріоконсервації та використання сперми плідників та ембріонів ссавців, а також численних технологічних розробок щодо підвищення репродуктивної здатності плідників і маточного поголів'я [2, 3, 11]. Федір Іванович у тісній співпраці з промисловими підприємствами розробив на рівні світових стандартів серію нових конструкцій кріогенних посудин Дьюара для сільського господарства та комплекти технологічних ліній для роботи племінних підприємств за новими біотехнологіями.

Академіком Ф. І. Осташком разом із учнями було створено банк генетичних матеріалів племінних тварин із подальшим накопиченням, оцінкою за якістю нащадків та системою їх використання в господарствах України. Тому і нині ці розробки актуальні для комплексного застосування у практиці як основа для нових біотехнологічних підходів у тваринництві. Відповідно до сучасних уявлень щодо ролі репродуктивної біотехнології в великомасштабній селекції під керівництвом Ф.І. Осташка була визначена основна стратегія кріобіотехнологічних досліджень, яка полягає у вивченні механізму температурного шоку сперматозоїдів та ембріонів ссавців, а також виробництво кріогенної техніки, спеціальних інструментів для осіменіння тварин і трансплантації ембріонів, спеціалізованого автотранспорту, нових матеріалів, реактивів, кріопротективних середовищ та відповідної апаратури [1, 7, 9].

Наразі інтенсифікація селекційного процесу в тваринництві призводить до зростання темпів витиснення локальних порід більш конкурентоспроможними. За даними Комісії з генетичних ресурсів тварин у сфері продовольства і сільського господарства (ФАО) за останні роки на планеті зникло понад 60 порід сільськогосподарських тварин разом з їх унікальною генетичною структурою [4].

Україною ратифіковано у 1994 році Конвенцію про біологічне різноманіття, схвалено Інтерлакенську декларацію (2007 рік), глобального плану дій ФАО щодо

генетичних ресурсів тварин (2008 рік), Нагойського протоколу про доступ до генетичних ресурсів тварин (2012 рік), що створює передумови для системного вирішення питань функціонування цілісної методології збереження біологічного різноманіття вітчизняного тваринництва.

Розпочинаючи з 1959 року академік Ф.І. Осташко спільно зі своїми учнями розробив і впровадив у виробництво перші на теренах колишнього Радянського Союзу технології заморожування сперми бугаїв та баранів і започаткував використання новітніх біотехнологій у тваринництві. Підсумком його наукових розробок стало створення системи, яка широко відома і впроваджена у виробництво під назвою «Харківська технологія кріоконсервації та використання сперми плідників та ембріонів ссавців».

Наразі створення нових конструкцій засобів та техніки для широкого впровадження у практику сучасних біотехнологічних методів відтворення та розмноження тварин відбувається у поєднанні з різними галузями народного господарства. Саме розкриття механізмів кріоушкодження та кріопротекції біологічних клітин Ф.І. Осташком створило підґрунтя для розробки сучасних методів та техніки штучного осіменіння тварин, а також забезпечило Україну комплексом кріогенного технологічного обладнання для роботи племінних підприємств.

Свої наукові погляди Ф.І. Осташко переважно спрямовував на розробку загальної та прикладної теорії кріобіології і створення біотехнологій кріоконсервації і використання сперми плідників. Чільне місце у цих дослідженнях займає розроблена Ф.І. Осташком теорія фортифікації мембранного апарата клітин ліпідними сполуками. Встановлено, що в разі обробки клітин речовинами полярних чи нейтральних ліпідів (яєчний жовток чи екстракт сої) забезпечує резистентність до перепадів температури, осмотичного та гідростатичного тиску, фазових переходів, тощо. Ліпідна композиція мембрани сперматозоїдів містить високий рівень поліненасичених жирних кислот, який знижується під час процедури заморожування-розморожування, тому утворення додаткової структури забезпечує збереження цілісності мембрани [6, 8].

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 при інституті Банку генетичних ресурсів тварин, який віднесеного до наукових об'єктів, що становлять національне надбання (розпорядження Кабінету Міністрів України від 19 серпня 2002 р. № 472-р.). Отже, **метою роботи** було узагальнення підходів щодо кріоконсервації еякульованих сперматозоїдів кнурів та забезпечити поповнення Банку сперматозоїдами української степової білої та української степової рябої породи свиней.

Матеріали та методи досліджень. Роботу проводили у дослідному господарстві Інституту тваринництва степових районів ім. М.Ф. Іванова «Асканія-Нова» – ННСГЦВ на свинях української степової білої та української степової рябої порід. Сперму відбирали мануальним методом від двох плідників породи українська степова біла (Арсенал 1669, Аспект 2029) та двох плідників породи українська степова ряба (Радій 317, Рекорд 237), віком 2-2,5 роки. В лабораторних умовах одразу після отримання сперму оцінювали за основними якісними показниками. Спермопродукція кнурів відповідала вимогам «Інструкції зі штучного осіменіння свиней» (2003).

Для підготовки гамет до кріоконсервації їх центрифугували при 3 100 об/сек (900 g) упродовж 5 хвилин та розріджували ЛГЖ-середовищем. Після розрідження сперми проводили 3-годинну еквілібрацію при температурі +4°С. Заморожування сперми здійснювали на фторопластовій пластині. Попередньо пластину охолоджували в парах азоту. В лунки фторопластової пластини вносили по 0,20 мл розбавленої сперми. Виживаність розмороженої сперми визначали оцінюванням загальної рухливості сперматозоїдів і підраховували час до повного припинення руху.

Результати досліджень. Серед численних результатів реалізації завдань програми наукових досліджень НААН «Збереження генофонду» Інститутом розведення і генетики тварин НААН забезпечено членство України з 2009 року у Європейському регіональному центрі генетичних ресурсів тварин (European Regional Focal Point for Animal Genetic Resources, ERFP) при ФАО. Оскільки генофондові стада (табл. 1) сільськогосподарських тварин є виробниками генофондової продукції у вигляді гамет, ембріонів та соматичних клітин, необхідно регульовано використовувати таку продукцію на різних етапах комплексу заходів збереження генофонду через функціонування Банку генетичних ресурсів тварин. Ефективність його роботи залежить від розподілу генетичного матеріалу у віртуальні генофондові кріостада, які мають кріоконсервований генетичний матеріал відомого походження та у кількості, яка є достатньою для відтворення генофондового стада тварин.

Слід наголосити, що свині української степової білої породи, яку було виведено академіком М.Ф. Івановим у 1925 році, є високопродуктивними, витривалими, пристосованими до місцевих умов та з міцною конституцією і універсальним напрямом продуктивності. Тварини української степової рябої породи свиней, виведеної у 1961 році, також мають універсальний напрям продуктивності, скоростиглі і з міцною конституцією, пристосовані до жаркого клімату та різких коливань температури.

У свинарстві застосування біотехнологічних методів набуває особливого значення з огляду на перспективи застосування кріоконсервації еякульованих сперматозоїдів, технологія якої вперше була розроблена в Інституті свинарства і агропромислового виробництва НААН. В результаті її застосування були одержані перші поросята у 1976 році. За результатами цих досліджень вихід життєздатних сперматозоїдів після розморожування сягав 50 %, показник запліднености свиноматок від 0 % до 80 %, багатоплідність – 3 – 14 поросят. До складу розбавника не додавали гліцерин, а спермодози мали об'єм 16 – 17 $см^3$ із концентрацією 2 млрд. сперматозоїдів [5].

В наших дослідженнях встановлено (табл. 2), що використання еякульованих сперматозоїдів від чотирьох кнурів забезпечує одержання еякуляту середнього об'єму 252,5 мл, середня активність сперматозоїдів склала 60 %. Хоча після розморожування активність сперматозоїдів була на рівні 20 %, а виживаність 2 години, перевірка запліднювальної здатності (Арсенал 1669) за результатами формування ембріонів свиней *in vitro* показала, що рівень запліднености яйцеклітин становить 49,2 (58 із 118 клітин), утворення ембріонів 29,7 % та розвиток ембріонів поза організмом на рівні 25,7 %.

Як свідчать дані наукової літератури, результати подальших досліджень щодо кріоконсервації сперматозоїдів кнурів забезпечують одержання нестабільних результатів ефективності їх кріоконсервації, що наразі свідчить про необхідність подальшого удосконалення технології, яка ґрунтується на двох основних чинниках – підбору кріопротекторів та режимів заморожування-розморожування. Проблема ефективної кріоконсервації полягає у подоланні порогу високої чутливості сперматозоїдів кнурів

до холодового шоку. Оскільки ліпідна композиція сперматозоїдів цього виду тварин містить високий рівень поліненасичених жирних кислот, під час кріопошкоджень він різко знижується, зокрема після фази розморожування через перекисне окислення (Cerolini, 2001). Крім того для забезпечення стабільності результатів кріоконсервації сперматозоїдів кнурів у виробничих умовах необхідно враховувати індивідуальні особливості плідник

Таблиця 1

Чисельність поголів'я по основних вітчизняних зникаючих породах сільськогосподарських тварин та птиці (згідно Держплемреєстру)

Порода	Кількість господарств	Всього, гол	у т.ч. маточного поголів'я, гол.
Велика рогата худоба			
Сіра українська	3	1188	440
Білоголова українська	1	546	200
Бура карпатська	6	2740	1122
Лебединська	2	428	146
Свині			
Миргородська	3	3837	383
Українська степова біла	3	1119	334
Українська степова ряба	1	84	26
Вівці			
Українська гірськокарпатська	9	5760	3144
Сокільська	2	361	275
Коні			
Гуцульська	2	125	45
Гуси			
Роменська	-	-	-
Кури			
Українська вушанка	-	-	-
Качки			
Українська чорна білогруда	1	345	-
Українська сіра	1	226	-
Українська глиняста	1	500	-

Таблиця 2

Характеристика еякульованих сперматозоїдів кнурів

Порода	Кличка №	Об'єм еякуляту, мл	Нативна сперма		Кріоконсервована сперма			
			кількість сперматозоїдів, млрд.	активність, %	кількість доз	активність %	концернтрація, млн/мл	виживаність, год.
Українська степова біла	Арсенал 1669	210	29,4	70	300	20	140	2
	Аспект 2029	250	39,3	80	320	20	171	2
Українська степова ряба	Радій 317	220	32,8	60	300	20	149	2
	Рекорд 237	330	46,9	70	320	20	142	2

Висновки: Оскільки призначення генофондових стад полягає у відтворенні притаманного окремим породам генофондового матеріалу, то основне завдання полягає у виробленні генофондової продукції з урахуванням всіх особливостей її використання на кожному етапі щодо регульованого збереження генетичного різноманіття. Відомо, що для сільськогосподарських тварин найбільш цінною є генетична мінливість, яка через різноманітність генів забезпечує формування продуктивних ознак. Тому необхідно зберігати гени та генні комплекси тварин, які забезпечують міцність конституції, резистентність, якість продукції. Згідно з «Програмою збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року» українську степову білу та українську степову рябу породи свиней віднесено до генофондового об'єкту України як місцеві породи, які розводяться лише в нашій державі і вже зараз перебувають на межі зникнення [10].

Бібліографічний список

1. Безуглий М.Д. Методи біотехнології відтворення сільськогосподарських тварин. – Х.: Харківський біотехнологічний центр, 2002. – 160 с.

2. Вчені-селекціонери у галузі тваринництва. Кн. 1; Під ред. академіків УААН М.В. Зубця, В.П. Бурката. – К.: Аграрна наука, 1997. – 252 с.

3. Вчені у галузі тваринництва. Кн. 2; Під ред. академіків УААН Г.О. Богданова, В.П. Бурката. – К.: Аграрна наука, 1999. – 424 с.

4. Гузєв І. В. Методологія збереження біорізноманіття генетичних ресурсів тваринництва України : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора с-г наук : 06.02.01 „Розведення та селекція тварин" / І. В. Гузєв. – Чубинське., 2012. – 40 с.

5. Методологічні аспекти збереження генофонду сільськогосподарських тварин / Ковтун С. І. у співавторстві (36 авторів); Укр. акад. аграр. наук, І-т розвед. і генетики тварин. – К. : Аграр. наука, 2007. – 120 с.

6. Осташко Ф.И. Биотехнология воспроизведения крупного рогатого скота. – К.: Аграрна наука, 1995. – 191 с.

7. Осташко Ф.І. Створення та впровадження у виробництво Харківської технології кріоконсервації гамет і зигот як засобу крупномасштабної селекції тварин: Зб. наук. пр. Ін-ту тваринництва УААН. – Х., 1999. – Вип.40. – С. 48-55.

8. Осташко Ф.І. Підсумки використання Харківської технології роботи племінних підприємству скотарстві і її переваги / Ф. І. Осташко // Наук.–техн. бюл. / УААН, Ін-т тваринництва. – Х., 2005. – № 93. – С. 66–74.

9. Осташко Федір Іванович: Бібліографічний покажчик наук. праць за 1952 – 2003 рр. – К.: Аграрна наука, 2004. – 104 с.

10. Програма збереження генофонду основних видів сільськогосподарських тварин в Україні на період до 2015 року / заг. наук. ред. І.В. Гузєва, консультація та специфікація Ю.Ф. Мельника. – К. : Арістей, 2009. – 132 с.

11. Харьковская технология асептического взятия и криоконсервации спермы быков-производителей: Метод. рек. / Под ред. Ф.И.Осташко. – Х.,1990. – 47 с.

КОМПЛЕКСНЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РЕАЛИЗАЦИИ ЗАДАЧ ПРОГРАММЫ СОХРАНЕНИЯ ГЕНОФОНДА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ В УКРАИНЕ

Рубан С. Ю., Ковтун С. І., Щербак О. В., Бірюкова О. Д., Інститут розведення і генетики тварин НААН

На основе обобщения научного наследия академика УААН Осташко Ф.И. обоснованы перспективы применения современных биотехнологий в системе сохранения генетических ресурсов животных на клеточном уровне. При применении криоконсервации эякулированных сперматозоидов хряков украинской степной белой и степной рябой пород отмечена необходимость проведения комплекса мероприятий по сохранению генетических ресурсов отечественных пород сельскохозяйственных животных, которые являются носителями ценных и уникальных генов.

Ключевые слова: сохранение генофонда, сельскохозяйственные животные, криоконсервация, эякулированные сперматозоиды.

BIOTECHNOLOGY COMPLEX FOR REALIZATION OF TASKS BY PROGRAM OF LIVESTOCK GENOFUND PRESERVATION IN UKRAINE

S. Ruban, S. Kovtun, O. Shcherbak, O. Birukova, Institute of Animal Breeding and Genetics UAAS

Based on the generalization of scientific results represented by F.I. Ostashko UAAS academician the perspectives of modern biotechnology application in the system of animal genetic resources preservation at the cellular level were substantiated. By using the cryopreservation of ejaculate sperm of Ukrainian breeds Steppe White and Steppe Spotted boars the necessity for holding the complex of measures for the preservation of domestic livestock breeds genetic resources, which are carriers of valuable and unique genes

Keywords: preservation of genofund, livestock, cryoconservation, ejaculated sperm.