ПОЛТАВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
Факультет технології виробництва і переробки продукції тваринництва
Кафедра технології виробництва продукції тваринництва

ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА

до кваліфікаційної роботи на здобуття ступеня вищої освіти

бакалавр

на тему: **«Застосування молекулярно-генетичних маркерів в селекції свиней»**

Виконав: здобувач вищої освіти
за освітньо-професійною програмою Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва
спеціальності 204 Технологія виробництва і переробки продукції тваринництва
ступеня вищої освіти бакалавр
групи 204ТВППТбд 31
Чибалін О.Ю.
Керівник : Світлана Усенко
Рецензент: Олена Мироненко

Полтава – 2022 року

Зміст

	стор.
ВСТУП	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	6
1.1. Маркерна селекція - сучасний підхід до конструювання генотипів тварин	6
1.2. Молекулярно-генетичні маркери в селекції свиней	8
1.3. Маркери мікросателітної ДНК та їх застосування для аналізу геному і в популяційно-генетичних дослідженнях сільськогосподарських тварин.	18
1.4. Локуси кількісних ознак	21
1.5. Поліморфізм мітохондріального геному свині	24
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛ І МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ	26
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	29
3.1. Загальна характеристика ТОВ «Нива Переяславщини»	29
3.2. Характеристика великої білої породи свиней	33
3.3. Оцінка гаплоїдного різноманіття свиноматок великої білої породи	40
3.4. Економічна ефективність	42
ВИСНОВКИ	44
ПРОПОЗИЦІЇ	45
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	46

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ВБ – велика біла порода свиней;

ДНК (DNA) - дезоксирибонуклеїнова кислота;

ПЛР (PCR) – полімеразна ланцюгова реакція;

ПДРФ – поліморфізм довжини рестриктних фрагментів;

п.н. – пари нуклеотидів;

рис. – рисунок;

см – сантиметри;

УВБ – внутрішньопородний тип великої білої породи української селекції;

УФ – ультрафіолетове опромінювання;

хв. – хвилини;

MAS – (від англ. marker assisted selection) – маркер-асоційована селекція;

pH – зворотній логарифм концентрації іонів водню, потенціал водню;

QTL – (від англ. quantitative trait loci) локуси кількісних ознак;

SNP – однонуклеотидний поліморфізм.

ВСТУП

Добре відомо, що ефективна селекційна робота можлива лише при точному знанні законів успадкування біологічних і господарських ознак, детальному аналізі генетичних процесів, що виникають в наслідок роботи селекціонера в окремих групах тварин та багаточисельних популяціях.

Сучасна генетика реалізує декілька проектів щодо селекційно-племінної роботи в свинарстві. Серед них генетичний контроль походження тварин та приналежності до певних генеалогічних груп, виявлення генетичних (цитогенетичних) аномалій для ефективного вилученню їх носіїв із стада. Широко практикується генетичний моніторінг селекційного процесу, в основі якого, як правило, імуногенетичне тестування тварин, визначення популяційних показників, інтенсивності мікроеволюційних процесів. Результат досліджень – корегування напрямку селекційної роботи, удосконалення її прийомів та заходів. Використовуються генетичні дослідження і для вирішення проблеми збереження генофонду свиней, разв'язання якої передбачає отримання „генетичного паспорту" породи [14, 44].

Однак одним із найбільш перспективних і активно розробляємих наукових проектів є молекулярно-генети чний аналіз генотипів, який проводиться на рівні геному тварини і дозволяє отримувати свиней із заданими генетичними характеристиками, підтримуючи високу продуктивність на протязі поколінь. Такий молекулярно-генетичний аналіз є основою маркерної селекції, впровадження якої знаходиться на порядку денному селекційних установ [30].

Перелік проблем селекційно-племінної роботи, які вирішують генетичні дослідження можна було б продовжити, але немає сумніву, що без використання сучасних генетичних технологій майбутні селекційні досягнення неможливі.

Мета роботи - проаналізувати технологію виробництва продукції свинарства у ТОВ «Нива Переяславщини» Київської області, дослідити генетичне різноманіття мітохондріального геному свиней великої білої породи.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **завдання**:

- провести аналіз літературних джерел за темою кваліфікаційної роботи;
- проаналізувати господарську діяльність та технологію виробництва свинини в ТОВ «Нива Переяславщини» Київської області;
- вивчити історію створення і навести детальну характеристику свиней великої білої породи української селекції;
- оцінити гаплоїдне різноманіття свиноматок великої білої породи;
- провести розрахунок економічного ефекту від впровадження розробки;
- на основі проведених досліджень і аналізу сформулювати висновки і розробити пропозиції виробництву.

Об'єкт досліджень – технологія виробництва продукції свинарства, мітохондріальні гаплотипи свиноматок B1, B2, C, G та J1.

Предмет дослідження – генетико-популяційна структура свиноматок великої білої породи.

Відомості про обсяг і структуру роботи. Кваліфікаційна робота викладена на 50 сторінці комп'ютерного тексту, що включає такі розділи; «Вступ», «Огляд літератури», «Матеріали і методи досліджень», «Результати власних досліджень», «Висновки», «Пропозиції», «Список інформаційних джерел». Робота ілюстрована 2 таблицями, 7 рисунками. Список літератури налічує 46 джерел.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Маркерна селекція - сучасний підхід до конструювання генотипів тварин.

Маркерна селекція або маркерасоційована селекція (MAS – marker association selection) – селекція за допомогою генетичних маркерів,. Принцип використаня генетичних маркерів в селекційному процесі ще був розроблений А.С.Серебровським в 30-х роках 20-го сторіччя. Він передбачає пошук і використання генетичних маркерів, які зчеплені з мінливістю господарських ознак, в селекції тварин [6, 15].

Генетичні маркери можна визначити, як алелі або гени, наслідування яких прослідковується в ряді поколінь і такі, що безпосередньо або опосередковано визначають певні ознаки. Відомо декілька типів генетичних маркерів: фенотипові, цитологічні, біохімічні, імунологічні та ДНК-маркери. Останні чотири типи ще називають молекулярно-генетичними – їх визначення проводиться на молекулярному рівні [6].

Серед наведених типів генетичних маркерів особливої уваги заслуговують ДНК-маркери, які дозволяють маркерувати тварину по будь-якому локусу генома, в будь-якому віці, їх інформативність вища за всі інші типи маркерів. В останні роки саме розробці технологій ДНК-маркерування приділяється найбільша увага дослідників. За допомогою ДНК-маркерів визначені локуси геному свині, які контролюють ознаки продуктивності, впливають на кількісну, мультифакторну мінливість. Ці локуси називають локусами кількісних ознак, QTL (quantitative trait loci). Маркерування по локусах кількісних ознак і є основою сучасної маркерної селекції, направленної на отримання бажаних генотипів. В одних випадках в якості генетичного маркера може виступати безпосередньо сам ДНК-локус - пряме

маркерування, в інших випадках – ДНК-послідовності, які з ним счеплені фізично (на генетичній карті хромосом розташовані поряд) або за принципом міжлокусної асоціації – непряме маркерування [2, 7].

Як приклад успішної розробки в галузі маркерної селекції можна навести технологію типування (маркерування) свиней по ріанодин-рецепторному гену (ryanodine receptor 1 gene). Встановлено, що ріанодин-рецепторний ген відповідає за розвиток стрессиндрому, який контролює синтез білка діючого як регулятор транспорта Ca2+ крізь канали саркоплазматичного ретикулуму скелетних м'язів. Виявлена точкова мутація в положенні 1843 ріанодин-рецепторний гена, яка відбулася внаслідок заміни цитозинового нуклеотиду на тиміновий, що призводить до заміни аргініну на цистеїн в 615 позиції амінокислотної послідовності білка а отже, зміні його рецепторної активності. Нуклеотидна заміна в зазначеному положенні, знищує сайт впізнавання для ендонуклеази Hha-1 і тому ця генна аномалія може бути ідентифікована за допомогою полімеразної ланцюгової реакції і рестриктного аналіза. В даному випадку має місце пряме генетичне маркерування по ріанодин-рецепторному гену, який контролює стресчутливість свиней. Ця технологія стала основою ДНК-діагностики стрессиндрому [17].

На основі технології розроблено селекційну систему отримання стресстійкого племінного молодняку, вільного від мутантного алелю, або гетерозиготного товарного поголів'я, яке характеризується наряду із стрестійкістю високими м'ясними і відгодівельними показниками.

В скотарстві практичного застосування набула технологія ДНК-маркерування і відбору тварин за геном каппа-казеіна. За її допомогою вирішується задача отримання молока більш придатного для виробництва твердих сирів. Саме ДНК-маркерування за геном каппа-казеіна, яке проводиться в будь-якому віці тварини і не залежить від її статі, дозволяє значно прискорити селекційний процес направлений на підвищення якості

молока. При традиційній оцінці якість молока по каппа-казеіну можна визначити лише при досягнені коровами дійного віку, а подібну ознаку у биків, взагалі, можна оцінювати лише за нащадками [13].

Подібні розробки для різних видів сільськогосподарських тварин маються і у відношені гена гормона росту, рілізінг-фактора гормона росту, гена міостатіна, гена рецептора естрогена та ряду інших. Не всі із них вже мають практичне застосування, але в перспективі, вони направлені на впровадження в маркерну селекцію.

1.2. Молекулярно-генетичні маркери в селекції свиней

Для аналізу генотипів та генетичної структури популяцій використовують декілька типів молекулярно-генетичних маркерів: імунологічні, біохімічні, цитологічні та ДНК – маркери. Останні є найбільш інформативними і точними за всі інші відомі типи генетичних маркерів [29].

Імунологічні маркери. Імуногенетика – наука, яка вивчає закономірності антигенних специфічностей крові та генетику імунних реакцій. На основі імунологічної реакції, результатом якої є утворення антитіл до певних антигенів розроблено методи використання останніх в селекції тварин в якості генетичних маркерів [30]. Як наука, імуногенетика сформувалася у середині 30-х років. Імуногенетика об'єднує методи імуногематології і генетики [32]. В тваринництві найбільш широке використання знайшли еритроцитарні групи крові.

Під групою крові розуміють визначені поєднання еритроцитарних антигенів (одного або декількох), які передаються від батьків нащадкам у вигляді генетично спільних спадкових комплексів. Еритроцитарні антигени, які контролюються алелями одного гену, складають конкретну систему груп крові [35]. За кожну систему групи крові відповідає визначений локус в хромосомі. Завдяки цьому генетично-контрольовані алелоформними генами групи крові утворюють генетичні системи.

На даний час добре вивчено 15 генетичних систем (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O) груп крові свиней [46], які об’єднують більш ніж 80 еритроцитарних антигенних факторів. Завдяки великому різноманіттю та незмінності в процесі життя вони з успіхом використовуються для контролю достовірності походження, а також для вирішення багатьох інших питань: вивчення генетичних особливостей порід, ліній, встановлення їх подібності та відмінності, дозволяє слідкувати за напрямом селекційних процесів в популяціях. Літературних даних про зв'язок груп крові свиней з їх кількісними ознаками існує досить багато [35]. Так, наприклад, був встановлений зв'язок між відгодівельними і м'ясними якостями свиней і антигенами Fa і Ma [7]. Свині з цими антигенами були більш скороспілими, ніж тварини, у яких були відсутні дані чинники. Була встановлена кореляція між площею «м'язового очка» і антигенами Ma і La. Краща оплата корму спостерігалася у свиней з антигенами Ma, Fa, Gb. Проте дещо пізніше, провівши аналогічні дослідження в тій же лабораторії, не підтвердив результатів, отриманих [3] про кореляцію наведених вище антигенів з відгодівельною і м'ясною продуктивністю свиней.

Таким чином, в цілому результати досліджень вказують на неоднорідність і складність зв'язків груп крові з кількісними ознаками. Отже, на основі лише цього класу маркерів аналізувати популяційні характеристики досить складно.

Біохімічні маркери. Під біохімічними маркерами розуміють поліморфні білки крові та інших біологічних рідин організму тварини. Поліморфізм проявляється у наявності в одній популяції різних генетично обумовлених молекулярних форм білку. При цьому білки не тільки є маркерами структурних генів, але і мають певну біохімічну функцію і що важливо, алельні варіанти білка успадковуються кодомінантно і не залежать від впливу зовнішнього середовища [34].

Одним із напрямів біохімічної генетики сільськогосподарських тварин

є використання поліморфних білків, як генетичних маркерів пов'язаних з продуктивністю або зі стійкістю тварин до різних захворювань. Прикладом цього напряму досліджень є роботи присвячені вивченню стресчутливості у свиней [34].

Одним з методів детекції поліморфізму білків є метод їх прямого електрофорезу.

Існують переваги та недоліки методу оцінки поліморфізму білків на основі їх електрофорезу. Безперечні переваги методу – досить висока роздільна здатність, що дозволяє розрізняти практично всі алельні варіанти одного локусу, можливість виявлення гомологічної мінливості в популяціях різних видів; можливість одночасного аналізу великої вибірки генів [34].

Інформація, яка отримана за допомогою біохімічних маркерів має певні обмеження. Так, не всі заміни нуклеотидів ДНК структурного гена білка приводять до амінокислотних замін у відповідній молекулі білка. Так само, як не всі амінокислотні заміни супроводжуються зміною електричного заряду білкової молекули, що виявляється при електрофорезі. Також, з'ясувалися і обмеження в застосуванні цього типу маркерів. Перш за все, це те, що аналіз білків дозволяє досліджувати поліморфізм тільки білок-кодуючих послідовностей і лише генів, що експресуються. При цьому з аналізу виключаються такі функціонально-значущі ділянки генів, як промоторні області, енхансери, різні сайти регуляції, розташовані в інтронах, нетрансльованих областях генів, а також поза генами, часто на значній відстані від кодуючої послідовності [34].

ДНК – маркери, типи і визначення. ДНК маркер - фрагмент ДНК відомого розміру і локалізації, який визначає будь-яку ознаку. Вирізняють досить багато типів ДНК – маркерів. Можна підкреслити, що класифікація ДНК - маркерів до цих пір не сформована, що пояснюється тим, що при введенні тих або інших модифікацій у відомий метод, часто дають нове найменування отримуваним маркерам.

ДНК-маркери, що засновані на аналізі рестрикційного поліморфізму. Відкриття рестрикційних ендонуклеаз (рестриктаз) [37], що розщеплюють ДНК в ділянках із певною послідовністю, дало поштовх до розробки ДНК - маркерів, в основі яких - виявлення рестрикційного поліморфізму ДНК. Метод, який для цього використовувався отримав назву ПДРФ (поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів від англ. RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism). Вперше ПДРФ був використаний, як генетичний маркер, в 1974 р. при ідентифікації термо - чутливої мутації в геномі аденовіруса [7]. Проте широке застосування варіантів поліморфізму ДНК, як генетичних маркерів почалося з 1980 р. після виходу роботи Ботштейна з співавт. [37], у якій були вивчені властивості ПДРФ, знайдено теоретичне обґрунтування його використання і запропонований метод оцінки рівня інформативності (PIC - polymorphism information content). ПДРФ використовують для аналізу поліморфізму конкретних локусів (генів). Спосіб аналізу ПДРФ зводиться до обробки ДНК рестриктазами з подальшим електрофоретичним розділенням отриманої суміші і визначенням довжин рестрикційних фрагментів після блот-гібридизації із специфічним міченим зондом.

З використанням ПДРФ-маркерів були отримані перші успішні результати по побудові молекулярно-генетичних карт багатьох видів рослин і тварин, накопичено багато відомостей про генетичний поліморфізм різних організмів, виявлені асоціації з господарсько-корисними ознаками [1, 10, 11]. Важливою перевагою даного типу маркерів є висока відтворюваність результатів, а також кодомінантний тип спадкування.

ДНК- фінгерпринт (DNA fingerprinting, DNA fingerprint technique, англ. finger - палець і print - друк, відбиток. синонім - "геномна дактилоскопія") - метод створення генетичних «відбитків пальців», заснований на аналізі поліморфізму ДНК. Метод ДНК - фінгерпринт запропонований А. Джеффрісом в 1985 р.

Потужним поштовхом для створення нових типів ДНК-маркерів став винахід Кері Мюллісом в 1983 р. методу ампліфікації in vitro певних ділянок ДНК в процесі температурних циклів полімеразної реакції, що повторюються (ПЛР - полімеразна ланцюгова реакція, англ. PCR - Polymerase Chain Reaction). У 1985 році цей метод був вперше застосований на практиці для ампліфікації ділянки гена бета-глобіна за допомогою великого фрагменту ДНК-полімерази (фрагмента Кленова) [43]. Широке розповсюдження ПЛР почалося з моменту публікації в 1988 р. роботи Сайки з співавт. [44], у якій автори використовували термофільну ДНК-полімеразу. Також автори розглянули теоретичні основи методу.

Метод ПЛР дозволяє швидко і з невеликими витратами матеріальних ресурсів і часу отримати більше 10 мільйонів копій певної послідовності ДНК, спочатку представленої однією або декількома молекулами. Різні модифікації методу ПЛР лягли в основу створення різноманітних типів ДНК-маркерів, що широко використовуються в даний час в різних областях біології і медицини.

ДНК-маркери на основі ПЛР з праймерами, що мають множинну локалізацію в геномі. Тобто використання одного короткого праймера з довільною послідовністю (RAPD - Randomly amplified polymorphic DNA), або при використанні праймерів із штучно доданими послідовностями (адаптерами) (AFLP - Amplified fragment length polymorphism) або праймерів, комплементарних до елементів генома, що повторюються, таким як мікросателіти (ISSR - Inter-simple-sequence-repeats) або транспозони (IRAP - Inter-retransposon amplified polymorphism).

RAPD-аналіз використовується своєрідним експрес-методом виявлення генетичного поліморфізму, що особливо актуально для маловивчених таксономічних груп. Діагностичні можливості RAPD-технології успішно проілюстровані на багаточисельних прикладах опису генетичної

різноманітності мікроорганізмів, вищих рослин, безхребетних і хребетних тварин [1, 8, 12].

Для дослідження варіабельності генома в цілому може бути також використаний метод аналізу AFLP. Цей метод також не вимагає ні попереднього клонування, ні секвенування ДНК. Особливості цього підходу полягають у використанні в якості матриці рестрикційних фрагментів ДНК, що ліговані із специфічними олігонуклеотидними адаптерами, і проведенні виборчої ампліфікації із спеціально сконструйованими праймерами. AFLP-маркери були успішно використані для геномного картування [23, 39], в популяційних і філогенетичних дослідженнях.

Для створення ISSR-маркерів використовують праймери, комплементарні повторам (4-12 одиницям повтору) мікросателітів і що несуть на одному з кінців послідовність з двох-чотирьох довільних нуклеотидів (так званий «якір»). Такі праймери дозволяють ампліфікувати фрагменти ДНК, які знаходяться між двома достатньо близько розташованими послідовностями мікросателітів (як правило, це унікальна ДНК). В результаті ампліфікується велика кількість фрагментів, представлених на електрофореграмі дискретними смугами (ISSR-фінгерпринтінг). Отримані патерни ПЛР-продуктів видоспеціфічні [19, 24]. Метод має гарну відтворюваність і разом з AFLP може бути з успіхом використаний для виявлення міжвидової і внутрішньовидової генетичної мінливості, ідентифікації видів, популяцій, ліній, а у ряді випадків і для індивідуального генотипування. ISSR-маркери можуть бути використані також для картування геномів і маркування господарсько- корисних ознак [41, 42].

Гіперваріабельні сателітні повтори є інформативними маркерами і являють собою мультиалельні системи з рівнем гетерозиготності, що досягає 70-90%.

Мінісателітні маркери являють собою тандемно розташовані однакові за структурою нуклеотидні послідовності - мотиву, що багато разів повторюються. Довжина мотиву складає від 9 до 100 і більш п.н. Сайти локалізації мінісателітів називають локусами з варіюючим числом тандемних повторів (VNTR-локуси, (variable number tandem repeats) [37].

Мінісателіти використовують в якості маркера при картуванні структурних генів, діагностиці захворювань і ДНК-фінгерпринтируванні.

Мікросателітні маркери – перші, отримані з використанням ПЛР, високополіморфні маркери для індивідуальних локусів. Подібно до мінісателітів, мікросателіти відносяться до тандемно розташованих однакових за структурою нуклеотидних послідовностей (ди-, три- і тетрануклеотиди) і спільний розмір області, що повторюється, істотно коротші (як правило, не більше 100 п.н.). Ці маркери відомі під декількома назвами: мікросателіти, STMS (Sequence Tagged Microsattelite Site), STR (short tandem repeat), SSR (simple sequence repeat). Для створення STR підбираються праймери до унікальних послідовностей ДНК, що вимагає попереднього знання їх нуклеотидної послідовності. Поліморфізм STR визначається різним ступенем копіювання однакових за структурою нуклеотидних послідовностей в кластері, що призводить до існування множинних алельних варіантів. Гетерозиготність їх дуже висока (часто більше 75%).

Гіперваріабельні сателітні повтори є універсальною системою генетичних маркерів для аналізу змін на рівні ядерної ДНК і широко використовуються в дослідженнях генетичного поліморфізму популяцій людини, рослин і тварин.

Поліморфні маркери, засновані на аналізі однонуклеотидних замін (SNPs).

Згідно загальноприйнятому визначенню SNPs (від англ. Single Nucleotide Polymorphism) – це однонуклеотидні позиції в ДНК генома, для

яких в популяції є різні варіанти послідовностей (алелі) з частотою рідкого аллеля не менше 1%. У бази даних SNPs зазвичай включають всі невеликі зміни послідовностей (невеликі інсерції/делеції (так звані "intels"), зміни декілька нуклеотидів) геномів, хоча вони і не входять у формальні визначення SNPs. Зазвичай SNPs представлені двома алельними варіантами, хоча зустрічаються і трьохалельні SNPs (наприклад, в геномі людини їх близько 0,1% від всіх SNPs) [40, 41].

SNPs не є абсолютно новим типом ДНК-маркерів. Найперші ДНК-маркери (ПДРФ-маркери) також відноситься до цього типу. Проте введення цього терміну дозволило об'єднати під спільною назвою всі маркери, обумовлені одиночними нуклеотидними замінами в послідовності ДНК, незалежно від способу їх тестування.

SNPs надзвичайно широко поширені не лише в геномі людини, але і в геномах інших організмів. В наш час в базах даних по нуклеотидним послідовностям людини представлено близько 6 млн. SNPs. Величезна кількість SNPs в геномі людини дозволяє відібрати порядка 100000 так званих "поширених" (з частотою рідкого алеля більше 20%) SNP-маркерів, при середній відстані між маркерами 30 т.п.н. Слід зазначити, що у 2009 році був розшифрований геном свині та розроблено SNP чіп (варіант ДНК-мікрочіпа), що містить 60000 генетичних маркерів геному. Ніякий інший тип відмінностей геномів не здатний забезпечити таку щільність маркерів. Окрім високої щільності, SNPs мають низький рівень мутацій на покоління ($\sim 10^{-8}$), що робить їх зручними маркерами молекулярної еволюції при оцінці великомасштабних еволюційних подій [45].

Основною перевагою SNPs є можливість використання автоматичних методів їх детекції, наприклад, використання ДНК-мікропанелі (microarrays) [7].

Найбільш простий і надійний спосіб ідентифікації SNPs у добре вивчених об'єктів - комп'ютерний аналіз, представлених в базах даних.

Фізичні методи детекції SNP. Альтернативою існуючим методам детекції поліморфних ділянок ДНК є мас-спектрометричне диференціальне секвенування. Час, що витрачається на аналіз кожного зразка цим методом складає всього декілька секунд. Метод дуже чутливий, дозволяє диференціювати гомо- і гетерозиготи і оцінювати частку SNP при одночасному аналізі декількох зразків [6].

Секвенування. Найточніший метод детекції SNP, поза сумнівом, пряме секвенування ділянки генома, яка нас цікавить. Але це дорогий і трудомісткий метод при масовому аналізі зразків. Запропоновано декілька модифікацій реакції, що знижують її вартість, наприклад, секвенування обох ланцюгів в одній реакції з використанням двох різних мічених праймерів, поєднання ПЛР і секвенування в одній пробірці відразу для декількох локусів [7] та інші.

ПЛР-ПДРФ. Цей метод відноситься до ферментативних методів аналізу SNPs і аналогічний методу ПДРФ, але в його основі використовується ПЛР. Рестрикції (однією або декількома рестриктазами) в цьому випадку піддаються продукти ампліфікації, а не частина ДНК генома. Завдяки простоті і надійності метод набув широкого поширення і до цих пір використовується для аналізу алельного поліморфізму генів у найрізноманітніших об'єктів. Обмеженням методу є те, що з його допомогою можна тестувати тільки відомі мутації, що зачіпають сайти рестрикції.

Алель-специфічна ПЛР. Алельні варіанти розрізняються за рахунок того, що 3'-кінцевий нуклеотид одного з праймерів гібридизується безпосередньо з варіабельним нуклеотидом (позиція SNP), що обумовлює наявність або відсутність ПЛР [78]. Специфічність реакції можна підвищити, вводячи додатковий, не спарений нуклеотид в другій або третій позиції з 3'-кінцець цього ж праймера або використовуючи конкуруючу ПЛР в тій же пробірці [15, 16]. Алель-специфічна ПЛР широко використовується для типування окремих алелей генів, або груп алелей, що несуть однакові

мотиви, наприклад, для типування алелей, що визначають стійкість або сприйнятливість великої рогатої худоби до лейкозу [38, 40].

На даний час здійснюється генотипування за допомогою ПЛР в реальному часі з використанням флуоресцентно-мічених зондів тобто технологія TaqMan. Ця технологія забезпечує можливість масштабних досліджень із застосуванням високощільних біочіпів.

ПЛР з термінацією синтезу. Існує декілька варіантів цього підходу. У одному з них ПЛР проводиться по стандартній схемі, але один з дезоксинуклеозидтрифосфатів береться в лімітуючій реакції концентрації [7]. Це призводить до того, що після декількох циклів синтез ДНК обривається в позиціях, відповідних лімітуючому нуклеотиду. Реакція нагадує секвенування.

Одноланцюговий конформаційний поліморфізм ДНК (SSCP, Single Strand Conformation Polymorphism) особливо ефективний для пошуку нових однонуклеотидних замін в ДНК. Метод SSCP полягає в наступному: після проведення ПЛР продукт ампліфікації денатурують і отримані однонитьові молекули розділяють за допомогою електрофорезу в поліакріламідному гелі [21]. Будь-яка нуклеотидна заміна в досліджуваній послідовності приводить до зміни заряду одноланцюгового фрагмента, а отже, і його електрофоретичній рухливості і може бути використана, як поліморфний варіант.

Таким чином, ДНК маркери - це більш перспективне покоління генетичних маркерів, що відрізняються від імунологічних, біохімічних та цитологічних типів маркерів більшою кількістю і частотою зустрічальності у геномах еукаріот і засновані на універсальних, широко використовуваних методах аналізу, які постійно розвиваються. Вони є більш економічно виправдані і прогностично точні, ніж інші типи маркерів. З ДНК-маркерів більш широкого використання набули маркери засновані на однонуклеотидному поліморфізмі. Вони використовуються у прикладних та

фундаментальних дослідженнях, зокрема в селекції. Загалом, застосування маркерів цього типу дозволило вийти на новий рівень розуміння організації та еволюції геномів досліджуваних об'єктів.

1.3. Маркери мікросателітної ДНК та їх застосування для аналізу геному і в популяційно-генетичних дослідженнях сільськогосподарських тварин.

На сьогоднішній день набирають силу в генетико-популяційних дослідженнях і картуванні генів поліморфні ДНК-маркери, такі як мікросателіти (відомі абревіатури МКС англ. STR - loci).

Вперше мікросателіти були виявлені в ДНК краба. Це ділянки ДНК, в яких тандемно повторюються послідовності довжиною 1 – 6 нуклеотидів, наприклад (GA)n, (GAG)n, (AGAT)n. Кількість повторів (n), як правило, високополіморфне і підпорядковується менделівському принципу успадковування. Визначення генотипів не створює труднощів, так як кількість повторених блоків пропорційне довжині ампліфікованого фрагменту між двома праймерами, що фланкують район повтору.

Мікросателіти в геномі розподілені більш рівномірно в порівнянні з іншими маркерами. Деякі автори вважали, що мікросателіти – це селективно нейтральні послідовності, які випадково чи майже випадково розподіляються по еухроматичному геному.

Але з аналізу літературних джерел витікає, що розташування МКС в геномі не є випадковим. Припускають, що чисельні мікросателіти та мінісателіти є “гарячими точками” для рекомбінації.

МКС – це єдиний тип поліморфних маркерів, представництво яких спостерігається в центромірних районах. В цих ділянках геномів багатьох видів організмів виявлені довгі мікросателітні локуси з моно-, ди-, три- та тетрануклеотидними послідовностями з високим ступенем кластеризації у томатів, арабідопсісу, цукрового буряка *Beta vulgaris*. Скупчення

різноманітних тандемних послідовностей в хромосом-специфічних повторах є спільними для центромерів багатьох видів. Це дозволяє припустити, що еволюційний механізм (чи декілька механізмів), створює і підтримує високовпорядковані повтори, консервативні в їх геномах [1].

МКС розташовані як в некодуючих так і в кодуючих ділянках генома різних організмів. Численні приклади свідчать про те, що МКС-локуси, розташовані в промоторних ділянках можуть впливати на генну активність. $(TC)_n$-послідовність в промоторних ділянках виконує функцію, як було встановлено, транскрипційного елемента для гена протеїнів теплового стресу *hsp26* у дрозофіли, *Phytophtora*. Вирізання різних ди- – тетрануклеотидних послідовностей значно змінюють транскрипційну активність. В зв'язку з високою варіабельністю МКС було запропоновано кілька моделей еволюції мікросателітних локусів. Поліморфізм по довжині може бути наслідком помилок реплікації, що підтверджується експериментами, що відтворюють механізм реплікації in vitro. Під час ПЛР ампліфікації можливі схожі ситуації, що призводить до виникнення так званих "затінкових зон", менших чи більших за довжиною в порівнянні з істинним алельним обмеженням на використання мікросателітів як поліморфних генетичних маркерів [6].

Найбільш розповсюджені динуклеотидні повтори (CA)n, що складають по різних підрахунках до 0,5 % тотального генома людини. Ця величина близька і для генома сільськогосподарських тварин. Для людини кількість блоків складає від 10 до 60 , але, як правило 15-30. За існуючими оцінками кількість (CA)n мікросателітів складає 50000 представників, розташованих на відстані 30 кб.

До 1996 р. на генетичній карті людини (Genethon), було вказано положення більше 5000 мікросателітних повторів (CA)n, з середньою гетерозиготністю 70%. Вони локалізовані по всьому геному з 22 проміжками близько 10 сМ і майже половина всіх локусів лежить на відстані менше 1 сМ від якого-небудь з цих повторів.

Деякі аспекти розподілу МКС вказує на їх можливу роль в таксонспецефічній структурі хромосом. Наприклад, маркери гібридизації мікросателітів виявлені в споріднених хромосомних ділянках, незалежно від використаного мотиву, показали винятково подібні патерни розподілу у пшениці та жита, що свідчить про особливу роль МКС в хромосомній організації в якості можливого прадавнього компонента генома родини *Triticae*. В середньому тринуклеотидні повтори зустрічаються через кожні 300-500 кб., відповідно їх частота в 10 разів менша ніж динуклеотидних повторів. Частіше зустрічається тип - (AAB)n (де B=C,G, або T). Рідше зустрічаються тетрануклеотидні повтори, їх типовим представником є повтор (AAAB)n (B- як вище). Є дані про 850 тетрануклеотидних повторів, що розташовані в аутосомах в середньому на відстані 7,4 сМ і з середньою гетерозиготністю більше 70 %. Взагалі, МКС описані для широкого кола організмів: людини, миші, собаки, бика, вівці, свині [13, 15, 30].

Що до генома свині, то приблизно 13% генів містять МКС. Найбільш часто зустрічаються динуклеотидні повтори типу AC/GT (3, 9%) -в 181 ядерному гені [7]. Повтор типу (CA)n має приблизно від 65000 до 100000, (GA)n - 5 000 копій на гаплоїдний геном. Взагалі, прості повтори розподіляються наступним чином: одно- 27, 3%, дво- 30, 3%, три- 15, 1%, чотиринуклеотидні повтори – 27,3%. Двонуклеотидні повтори різняться за відсотковим вмістом у різних видів і складають 28% від інших простих повторів у людини, 30, 3% у свиней, 12, 1% у курей.

Останнім часом, для виявлення локусів МКС найчастіше використовують ПЛР, завдяки чому стало можливим проведення аналізу їх поліморфізму за кожним, окремо обраним локусом.

ДНК-типування може бути використане у специфічних цілях розведення, наприклад, для телят або поросят, які народилися в результаті ембріотрансплантації, при гетероспермному осіменінні свиноматок, для

контролю походження племінних тварин у свинарстві, де мають місце випадки пересадки поросят в інші гнізда.

Можна передбачати визначені перспективи цього підходу задля вирішення проблем популяційної генетики, створення карт зчеплення генів, "паспортизації" та відбору чистопородних тварин, типування сортів рослин, виявлення міжвидових та міжпородних (сортових) відмінностей.

1.4. Локуси кількісних ознак

Необхідною частиною селекційної роботи є оцінка тварин, яка проводиться за їх власною продуктивністю та за якістю нащадків. За результатами такої оцінки роблять висновки про генетичний потенціал конкретної особини і перспективах її використання в стаді.

Однак, інформація, що отримана саме таким шляхом, є недостатньо точною і повною, методика оцінки потребує досить богато часу, досягнення тваринами певного віку, створення для свиней, яких оцінюють, однакових стандартних умов утримання і годівлі, що не завжди можливо. Тому такий підхід не завжди забезпечує точне визначення генетичного потенціалу тварини.

Нові відкриття в галузі молекулярної генетики дозволили виявити локуси геному свині, які контролюють важливі ознаки, і здійснювати за допомогою молекулярно-генетичних маркерів генотипування тварин. Генотипи за цими локусами є певними прогностичними, об'єктивними маркерами продуктивних якостей, на основі яких можна отримувати особин з заданими параметрами. Такі локуси отримали назву – локуси кількісних ознак (QTL – quantitative trate loci) [17, 22, 44].

На основі генетичного маркерування тварин по QTL в багатьох країнах з розвиненим свинарством успішно проводиться маркерна селекція. Так в Чехії, завдяки гранту міністерства сільського господарства, реалізуються

проекти: «Створення і селекція суперплодовитих ліній свиней з використанням генетичних маркерів» та «Розвиток методів аналізу QTL-локусів та їх використання в селекції з метою покращення репродуктивних та м'ясних якостей свиней» (Сільськогосподарський та лісовий університет, Брно). В Білорусі за підтримки знов таки ж грантів міністерства сільського господарства проводиться масове типування свиней за ріанодин-рецепторним геном з метою вилучення із стад носіїв мутантного алеля, що є причиною стрессиндрому, активно проводяться дослідження щодо генетичного покращення репродуктивних ознак свиней на основі ДНК-маркерування за геном ESR.

Цілий ряд досліджень проведених на європейських та американських породах свиней свідчить про доцільність використання в селекції ДНК-типування тварин по локусах кількісних ознак. До них відносяться: локуси гена рецептора естрогену (gESR), гена міостатіну (gMSTN), гена рецептора пролактину (gPRLR), гена інсуліноподібного фактора росту 2 (gIGF-2), гена гормона росту (gGH) та інші. Для вітчизняного свинарства актуальним є аналіз зв'язку цих генів, що належать до локусів кількісних ознак (QTL), з репродуктивними, відгодівельними та м'ясними якостями свиней саме вітчизнянних генотипів з подальшою розробкою молекулярних тестів оцінки генотипів та їх використанням у селекційному процесі. Крім того визначені популяційні параметри за цими локусами можуть бути використані для генетичної паспортизації порід свиней [25, 42].

Локус гена інсуліноподібного фактора росту II. Інсуліноподібний фактор росту 2, ще відомий як соматомедин А, діє як стимулятор росту на клітинному рівні, а його синтез контролюється гормоном росту. У свиней ген інсуліноподібного фактора росту 2 знаходиться у другій хромосомі і представлений декількома алельними варіантами, які характеризуються однонуклеотидними замінами (SNP) в другому інтроні (алель А і алель В, NciI (BcnI) – полиморфний сайт рестрикції, заміна G→A) [8, 9, 10]. Крім

того, знайдений однонуклеотидний поліморфізм в третьому інтроні (IGF2 in3 G3072A) и три в сьомому інтроні [11]

В ряді робіт [9, 12] встановлені популяційні параметри у відношені IGF2-гена в породах свиней, що разводяться в Європі та Азії, виявлені сприятливі алельні варіанти гена для формування важливих господарських ознак. Для окремих порід свиней, що розводяться в Україні також проводився подібний аналіз, але для великої білої породи (УВБ1) та мейшан дані щодо поліморфізму IGF2-локусу відсутні.

Локус гена міостатина. Міостатин (фактор диференціації росту 8; GDF8; MSTN), член бета суперсімейства фактора диференціації росту. Є суттєвим для росту та розвитку м'язової тканини, функціонує як негативний регулятор маси скелетної мускулатури. У великої рогатої худоби мутації в гені порушують структуру білка міостатина, що призводить до мускульної гіпертрофії.

У свиней для даного гена визначено поліморфізми:

1.) в області промотора – по сайту рестрикції ендонуклеази DraI, поліморфізм (T/A). Може виникати два алелі, які характеризується фрагментами рестрикції 422 п.н. і 358 п.н., відповідно. Порівняння ДНК-послідовностей цих аллелів (у свиней п'єтрен і мейшан) продемонструвало поліморфізм (T/A) в положении 607 п.н. послідовності (EMBLNEW AJ133580)

2.) поліморфізм ДНК-послідовності в області 3-го экзону гена міостатина (транзиція C → T) в позиції 2150 п.н. послідовності у порід п'єтрен і ландрас. Визначається шляхом рестриктного аналізу за допомогою ендонуклеази *Taq*I (наявність/відсутність сайту рестрикції). В результаті можуть зустрічатися два алелі: T (фрагмент рестрикції розміром 139 bp) і C (фрагмент рестрикції 111 bp). Частоти алелів для 98 свиней породи ландрас: T=0,18 та C=0,82.

1.5. Поліморфізм мітохондріального геному свині.

Мітохондрія - органоїд еукаріотичної клітини, головною функцією якого є утворення енергії. За розмірами мітохондрії співрозмірні з бактеріями. Кількість мітохондрій в одній клітині сягає 100 тисяч і більше [13]. Мітохондрії дуже схожі на бактерії - розмножуються діленням та мають власний геном. Через те, що яйцеклітина вносить в зиготу значно більше цитоплазми чим сперматозоїд, а у деяких тварин спермій узагалі не вносить цитоплазму в зиготу, мітохондріальний геном успадковується від матері. [14, 15]. Наприклад, у яйцеклітині миші є 90 тисяч мітохондрій, а в сперматозоїді - лише чотири.

Очевидно, що в заплідненій яйцеклітині мітохондрії переважно або тільки від жіночої особини, тобто спадкування всіх митохондриальных генів материнське. Це підтверджується дослідженнями випадків спадкових захворювань, пов'язаних із мутаціями мітохондріальної ДНК [16]. В останні роки були отримані і інші докази материнського успадкування мітохондрій. Так, шляхом прижиттєвого флуоресцентного мічення мітохондрій сперми була зафіксована їх деградація в цитоплазмі запліднених *in vitro* ооцитів свині вже через 12-20 годин [17]. Зрозуміло, якщо мітохондрії успадковуються по материнській лінії то разом з ними успадковується і їх ДНК-маркери.

Таким чином, нащадки однієї свиноматки, повинні мати одну спільну форму - гаплотип мітохондріальної ДНК, а іншого материнськог походження інший. Під час еволюції виду *Sus scrofa* утворилося 16 підвидів дикої свині. В різних центрах доместикації були одомашнені різні підвиди дикої свині. Специфічні варіанти мітохондріальної ДНК (гаплотипи) різних підвидів були успадковані спочатку місцевими, а від них і міжнародними породами свиней. В ході досліджень по вивченню біорізноманіття були накопичені дані про породоспецифічні однонуклеотидні поліморфізми. Для кожної породи може

існувати один, або декілька гаплотипів. Наприклад у великій білій породі визначають аж три гаплотипи, один так званий європейський гаплотип ***L,*** та два азійських – ***J*** та ***N***. Специфічні породам мітохондріальні гаплотипи можливо використати для паспортизації порід [18].

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводидись у ТОВ «Нива Переяславщини» Київської області. В умовах господарства утримується поголів'я свиней великої білої породи.

Під час виконання кваліфікаційної роботи проаналізовано господарську діяльність ТОВ «Нива Переяславщини» Київської області, технологію виробництва продукції свинарства, досліджено генетичне різноманіття мітохондріального геному свиней великої білої породи.

Оцінка гаплоїдного різноманіття свиноматок великої білої породи проведена за даними лабораторії генетики Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН, що має статус лабораторії генетичного контролю (сертифікована для проведення генетичного аналізу на рівні ДНК свідоцтво про атестацію №021-19 від 31.01.2019 року Міністерство аграрної політики України). В якості матеріалу для досліджень були відібрані зразки щетини 25 свиноматок великої білої породи, які представляли усі родини ТОВ «Нива Переяславщини».

Аналіз генетичної структури популяцій за молекулярно-генетичними маркерами передбачає оцінку наступних параметрів: частот алелей та генотипів, визначення генетичної рівноваги, оцінка генетичних відстаней. Головні формули, що використовували для обчислення основних популяційно-генетичних характеристик наведено нижче.

1. Розподіл генотипів (очікувана кількість) відповідно до формули Харді – Вайнберга: $p^2 + 2pq + q^2 = 1$,

де p – частота гомозигот за одним алелем; q – частота альтернативного алеля.

2. Розрахунок частот алелей у моногенних диалельних системах:

$$p(A) = \frac{2N(AA) + N(Aa)}{2N\text{заг.}} \quad (2.1)$$

$$q(a) = \frac{2N(aa) + N(Aa)}{2N\text{заг.}} \quad (2.2)$$

або

$$q(a) = 1 - p(A) \quad (2.3)$$

Де *Nзаг.* – загальна чисельність особин з генотипами *AA*, *Aa*, *aa*. Символом *pA* позначається відносна чатота алеля А, символом *qa* – відносна частота алеля а

Статистичну обробку результатів ДНК-типування проводили на персональному комп'ютері за допомогою відповідних програм. Для розрахунків основних популяційних характеристик (частоти алелів, генотипів) використовували програму GENALEX 6. Отримані числові дані генетичних дистанцій аналізували програмами TREE та MEGA-4 [96] з наступною побудовою дендрограм.

Окремі популяційно-генетичні характеристики обчислені за допомогою середовища Excel 2007.

Аналіз первинної послідовності гену виконували за допомогою комп'ютерної програми Primer3 для даної пари праймерів.

Економічну ефективність обчислювали відповідно до „Методики визначення економічної ефективності використання у сільському господарстві науково-дослідних і дослідно-конструкторських робіт, нової техніки, винаходів і раціоналізаторських пропозицій" [20] за формулою:

$$E = Ц \cdot \frac{C \cdot П}{100} \cdot Л \cdot K, \quad (2.11)$$

Де Е - вартість додаткової основної продукції, грн.;

Ц - закупівельна ціна одиниці продукції за 2020 рік, грн.;

С - середня продуктивність тварин базового варіанту;

П - середня прибавка основної продукції, яка виражена у відсотках на одну голову, %;

Л - постійний коефіцієнт зменшення результату, який пов’язаний з додатковими витратами на прибуткову продукцію та дорівнює 0,75;

К - чисельність поголів’я сільськогосподарських тварин нового або поліпшеного варіантів, голів.

Розрахунок економічної ефективності зроблено з врахуванням покращення продуктивності свиней та ефективності використання свинарських приміщень.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Загальна характеристика ТОВ «Нива Переяславщини»

ТОВ «Нива Переяславщини» приватне сільськогосподарське підприємство, яке має замкнений цикл виробництва. Основні види діяльності: вирощування та зберігання зернових; виробництво комбікормів, вирощування і відгодівля свиней, переробка м’ясної продукції, реалізація продукції ТМ "П'ятачок" у власній торгівельній мережі.

Головний офіс знаходиться за адресою - Київська область, Переяслав-Хмельницький район, с. Переяславське, вул. Привокзальна, 2.

Відділки підприємства працюють на території 23 територіальних горомад, що входять до п'яти районів Київської області. Загальна площа земельних угідь становить біля 23 000 га ріллі, 6000 орендованих у громадян паїв в Баришівському, Броварському, Згурівському, Переяслав-Хмельницькому, Яготинському районах Київської області..

Для ефективного господарювання впроваджено сучасні методи організації виробництва, широко впроваджуються інноваційні агротехнології, використовуються високопродуктивні сорти насіння вітчизняної і зарубіжної селекції.

Постійно вносяться у грунт органічні добрива, що дає можливість отримувати стабільно високі урожаї та покращувати родючість грунту.

Підприємство повністю забезпечене необхідною сільськогосподарською технікою. Завдяки чому забезпечується замкнутий циклу польових робіт від підготовчих та посівних робіт і до збиральної компанієї.

Власне виробництво продукції рослинництва повністю задовольняє потреби Групи компаній "Нива Переяславщини" як сировину для комбікормів. Частину зернових культур реалізують.

У підприємстві є власний забійний цех, а також цех з виробництва м'ясної продукції.

Це дозволяє контролювати якість продукції на всіх етапах виробничих процесів та досягати високих показників рентабельності.

Група компаній «Нива Переяславщини» займає міцні позиції в рейтингу ТОП-20 найбільших платників податків серед аграрних підприємств України. Впродовж 2019 року підприємством сплачено до бюджетів всіх рівнів більше 200 млн грн, а у 2020 році – більше 300 млн грн.

За останні роки підприємство збудувало і експлуатує 13 біокотелень на соломі компанії «Maskinfabrikken Faust ApS» (Королівство Данія). Це повністю дозволяє відмовитись від використання природного газу. Екологічно чистою тепловою енергією повністю забезпечується безперервна діяльність усіх свинокомплексів в компанії.

Пріоритетним напрямком діяльності ТОВ «Нива Переяславщини» є виробництво продукції свинарства.

Перший свинокомплекс замкнутого циклу відгодівлі було збудовано у 2005 році. Його потужність складає 30 тисяч голів товарних свиней в рік. Перші ремонтні свинки було завезено в грудні 2005 р., а перші опороси отримано в травні 2006 р. На сьогодні в ТОВ «Нива Переяславщини» працює 12 свинокомплексів (рис. 3.1).

Рис. 3.1. Свинокомплекс №9 в Яготинському районі Київської області на 30 тис. голів свиней на рік на відгодівлі.

Племінне ядро маточного поголів'я свиней складає данська генетика компаній «Danbred A/S» та «Breeders of Denmark A/S». Це свині порід: ландрас, дюрок, велика біла англійської селекції.

Свинокомплекси є сучасними, екологічно безпечними, механізованими і автоматизованими (рис. 3.2.).

Рис. 3.2. Цех відгодівлі

У технології утримання і годівлі використовують системи автоматичної подачі корму «Skiold Transpork», водопостачання «Aqua Level», системи опалення, вентиляції і системи охолодження, які контролюються комп'ютерною програмою «Skov».

У секціях опоросу, дорощування, ремонтних свинок застосовується система підігріву підлоги.

В селі Переяславське у 2017 році збудовано очисні споруди для виробничо-побутових стоків за європейськими стандартами. При цьому використано обладнання австрійської компанії «Schneider Abwassertechnik GmbH».

На свинокомплексах працює самопливна система для видалення гною. Виробничі стоки через технологічний трубопровід стікають у цільнобетонні лагуни, які забезпечують повну екологічну і санітарно-епідеміологічну безпеку.

Гній з лагун вивозиться на поля, відповідно до розробленої схеми на основі рекомендацій і результатів аналізу грунту.

Науковий і інноваційний підхід з постійним удосконаленням виробничих процесів забезпечують високі показники продуктивності не лише за вітчизняними, а й за європейськими мірками (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Середні поточні показники роботи свинокомплексів ТОВ «Нива Переяславщини»

Показник	Середні показники роботи свинокомплексів
Народжуваність на 1 свиноматку, гол	15,2
Відлучено поросят від 1-ї свиноматки на рік, гол	32,5
Кількість опоросів на рік	2,4
Добовий приріст 1-ї голови на дорощуванні, г	420
Добовий приріст 1-ї голови на відгодівлі, г	920

У 2008 році підприємство запустило власну м’ясопереробку свинини. До складу входять: забійний цех (потужність 110 000 гол у рік), цех пакування охолодженого м’яса потужністю 10 тонн на добу, а також цех з виробництва готових виробів потужністю 5 тонн на добу.

Виробничі потужності укомплектовані новітнім європейським обладнанням торгових марок «Multivac», «Rex», «Laska».

У м'ясопреробному цеху виготовляють продукцію з охолодженої свинини. Використовують якісні матеріали для пакування, що гарантує отримання споживачем продукту з високими харчовими якостями та дотриманими вимогами гігієни та санітарії.

У підприємстві запроваджені системи ISO 9001 та ISO 22000, які гарантують безпечність на усіх етапах виробництва.

3.2. Характеристика великої білої породи свиней

Велика біла порода свиней виведена в середині XIX століття в Англії. Протягом тривалого часу в Україну завозилися свині великої білої породи з різних країн. Так, у 1930 році організовується мережа племінних радгоспів і паралельно завозяться свині великої білої породи з Англії [32, 33].

Свині цієї породи в Україні, як і в інших країнах, переважають за кількість і складають 70% по відношенню до інших порід. Тому саме від цієї породи та від її рівня продуктивності залежить виробництво свинини в Україні.

Генеалогічна структура породи містить внутрішньопородні та заводські типи, заводські лінії і родини, спорідені групи тварин (рис. 3.3.).

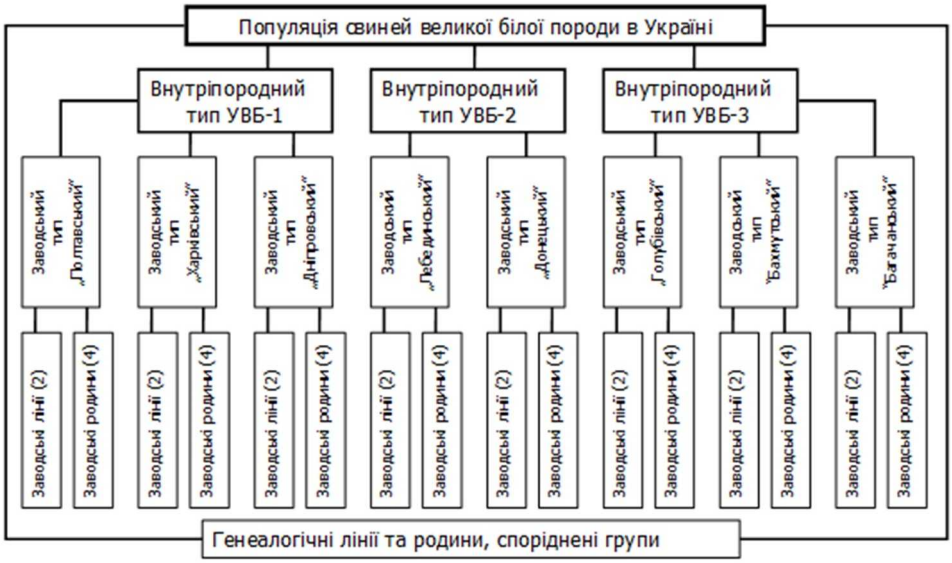

Рис.3.3. Генеалогічна структура великої білої породи

Свині великої білої породи української селекції. Генеалогічна структура породи представлена спеціалізованими внутрішньопородними і заводськими типами, генеалогічними і заводськими лініями і сімействами, родинними групами. Найбільш великими структурними одиницями в породі є внутрішньопородні типи [4, 5]. До них відносяться:

1. Материнський внутрішньопородний тип УВБ-1 і в його складі 3 заводських типи: полтавський, харківський, дніпровський. Перші два з них були апробовані в 1985, третій - у 1993 році. Напрямок селекційної роботи з внутрішньопородним типом - поліпшення на максимально високий рівень репродуктивних якостей, насамперед за багатоплідністю.

2. Проміжний батьківський внутрішньопородний тип з поліпшеними відгодівельними якостями УВБ-2 і в його складі 2 заводських типи: лебединський і донецький, заводські лінії і сімейства. Напрямок селекційної роботи з внутрішньопородним типом - підтримка високого рівня відгодівельних якостей (високі середньодобові прирости - 760-800 г, вік

досягнення маси 100 кг - 178-182 дні, витрати кормів на 1 кг приросту - 3,55-3,70 кормової одиниці).

3. Проміжний батьківський тип з поліпшеними м'ясними якостями (УВБ-3). Напрямок селекційної роботи з внутрішньопородним типом - підтримка високого рівня м'ясних якостей (вихід м'яса в туші - 60-61 %, товщина шпику на рівні 6-7 ребра - 20-22 мм, площа «м'язового вічка» - 36-38 см, довжина туші - 96-98 см.) .

Взагалі, свині великої білої породи - високопродуктивні, добре пристосовані до різних умов годівлі і утримання. Використовуються у селекції, як материнська, так і батьківська форма для схрещування і гібридизації [26, 28].

Недоліки породи: підвищена схильність до ожиріння. Не дуже приємний вигляд (екстер'єр): звислі крижі, погано виражений окіст, масть біла. Погано переносять сильні морози і спеку [36].

Фото окремих тварин породи Велика біла наведено нижче (Рис. 3.4.-3.6.).

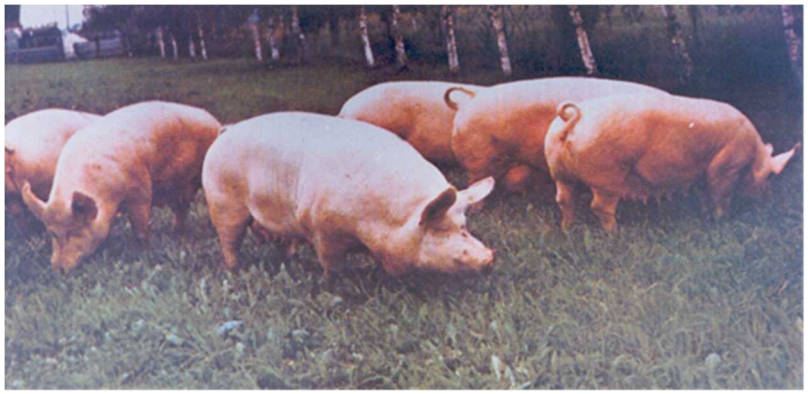

Рис. 3.4. Свині внутрішньопородного типу УВБ-2 з покращеними відгодівельними якостями.

Рис.3.5. Свиноматка внутрішньопородного типу УВБ-1 з покращеними репродуктивними якостями.

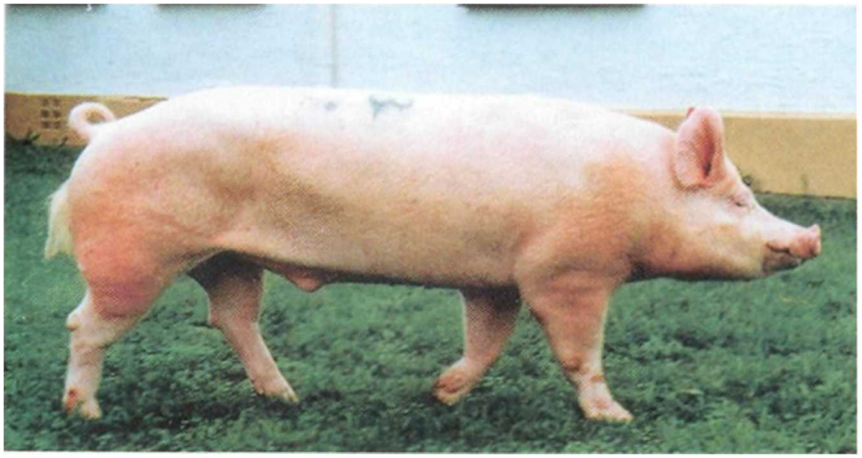

Рис. 3.6. Кнур внутрішньопородного типу УВБ-3.

У 2-х дослідних господарствах Інституту свинарства і АПВ НААН розводять свиней великої білої породи, саме у: ДП ДГ племзавод «Степне» (внутрішньопородний тип УВБ-1) і ДП ДГ племінний репродуктор «ім. 9 Січня».

Наукове забезпечення селекції свиней великої білої породи здійснюють Головний селекційно-генетичний центр (Інститут свинарства і АПВ НААН), Інститут тваринництва НААН та ін. наукові установи-співвиконавці селекційної програми з породами свиней.

Провідні науковці (куратори) роботи із породою: в минулі роки – О.І. Овсянников, Д.К. Білогуб, М.Т. Балашов, А.Х. Кащенко, К.Ф. Почерняєв,

Т.С. Журженко, В.П. Рибалко, Н.В. Півняк, Н.Д. Голуб, В.О. Медведєв, Н.А. Ноздріна; на даний період – М.Д. Березовський, Л.П. Гришина, Є.М. Агапова, М.С. Небелиця, В.І. Халак, П.А. Ващенко, В.О. Вовк.

3.3. Оцінка гаплоїдного різноманіття свиноматок великої білої породи

Одомашнення тварин було важливим кроком демографічного та культурного розвитку людини. Разом з одомашнення видів рослин було покладено і початок тваринництва. Протягом подальшої історії тваринництва еволюція, мутації, селекція, адаптація, ізоляція та генетичний дрейф створили величезне різноманіття місцевих популяції. В останні століття це призвело до формування багатьох чітко визначених порід з різним рівнем продуктивності які використовують з різною метою. Протягом останніх десятиліть розробка та використання ефективних програм відбору прискорили генетичне вдосконалення ряду порід. Штучне запліднення та передача ембріона сприяли поширенню генетичного матеріалу. Крім того, прогрес в технології годівлі дозволив забезпечити оптимальне живлення, а вдосконалені транспортні та комунікаційні системи привели до створення однакових і строго контрольованих виробничих умов, одноманітного та суворо контрольованого виробничого середовища.

В результаті високопродуктивні породи замінили місцеві породи у всьому світі. Такий розвиток спричинив зростання занепокоєння з приводу ерозії генетичних ресурсів. Оскільки генетична різноманітність порід з не дуже високою продуктивністю, ймовірно, буде робити внесок у селекцію ознак, що представляють інтерес, зараз або у майбутньому, вважається за необхідне їх збереження. За даними FAO, 20% з приблизно 7600 порід по всьому світі, до яких належать 18 видів ссавців та 16 видів птахів, знаходяться на межі зникнення, а 62 породи зникли протягом перших 6 років двадцять першого століття.

До 1970 року в Україні свиней великої білої породи розводили в 11 племінних заводах, 9 племінних господарствах і 48 племінних колгоспних фермах. Кількість чистопородних кнурів великої білої породи у 1973 році становила 98,3% від загального числа кнурів цієї породи, а свиноматок - 38,9% [5]. Ці дані дають нам змогу припустити, що у окремих племінних заводах великої білої породи могло зберегтися значне гаплоїдне різноманіття під яким розуміють різні варіанти мітохондріальних геномів.

Мітохондріальний геном на відміну від ядерного міститься в мітохондріях які знаходяться у цитоплазмі. Через те, що яйцеклітина вносить у зиготу значно більше цитоплазми, ніж спермій мітохондріальний геном успадковується лише від матері. [16, 21]. У яйцеклітині свині є до 100 тисяч мітохондрій, а в сперматозоїді – лише чотири. Очевидно, що мітохондрії в заплідненій яйцеклітині переважно походять тільки від жіночої особини, а завдяки деградації мітохондрій кнура в цитоплазмі запліднених ооцитів свині вже через 12–20 годин успадкування всіх мітохондрій, і відповідно мітохондріальних геномів – материнське. Саме така властивість мітохондріального геному надала можливість оцінити гаплоїдне різноманіття свиноматок великої білої породи ТОВ «Нива Переяславщини».

Нуклеотидні заміни в позиціях 15558, 15580, 15616, 15714, 15758 мітохондріального геному свині змінюють можливість ферментативного розщеплення ДНК і визначаються шляхом електрофоретичного розділення рестриктних фрагментів ампліфікатів. Різні комбінації поліморфізмів визначають 18 варіантів (гаплотипів) – мітохондріальних ДНК-маркерів, позначених латинськими літерами від ***A*** до ***P***. Для двох гаплотипів визначають підтипи ***B1, B2*** та ***J1, J2*** (табл. 3.2) **.**

Різні мітохондріальні ДНК-маркери зустрічаються у наступних породах свиней: ***A*** – дюрок (європейський тип), мангалицька; ***B1*** – миргородська; ***B2*** – велика чорна; ***C*** – ландрас, гемпшир, уельс, дика свиня (Україна, Польща); ***D, E, F*** – не знайдені серед порід свійської свині; ***G*** – уельс, дика свиня (Італія); ***H***

– не знайдені серед порід свині свійської; ***I*** – ландрас; ***J1*** – велика біла (азійський тип I), мейшан, азійська дика свиня; ***J2*** – велика чорна; ***K*** – не знайдені серед порід свині свійської; ***L*** – велика біла (європейський тип); ***M*** – дюрок (азійський тип); ***N*** – велика біла (азійський тип), беркшир, азійська дика свиня; ***O*** – ландрас, дика свиня (Швеція); ***P*** – азійська дика свиня (Японія).

Таблиця 3.2.

Характеристика мітохондріальних гаплотипів свиней

Варіабельні нуклеотидні позиції мітохондріального геному свині					Довжина рестриктнних фрагментів *TAS1* ділянки Д-петлі мітохондріального геному свині у парах нуклеотидів, що визначають гаплотип	Відповідність мітохондріальних гаплотипів певним породам свиней за літературними джерелами [4,5,6]
15558	15580	15616	15714	15758		
T	**T**	V*	V	V	383/23/22	*B1* миргородська, полтавська м'ясна
V	**T**	V	V	V	383/45	*B2* велика чорна
T	V	**T**	V	V	346/60/22	*C* ландрас, гемпшир, уельс, дика свиня (Україна, Польща)
T	V	**T**	T	**T**	203/180//23/22	*J* велика біла (азійський тип I), мейшан, азійська дика свиня
V	V	**T**	T	**T**	203/180/45	J2 велика чорна
T	**T**	V	T	**T**	203/136/44/23/22	*G* уельс, дика свиня (Італія)

Серед вибірки племінних свиней великої білої породи ТОВ «Нива Переяславщини» були визначені наступні мітохондріальні ДНК-маркери (гаплотипи): ***B1, B2, C, G*** та ***J1*** (рис. 3.7).

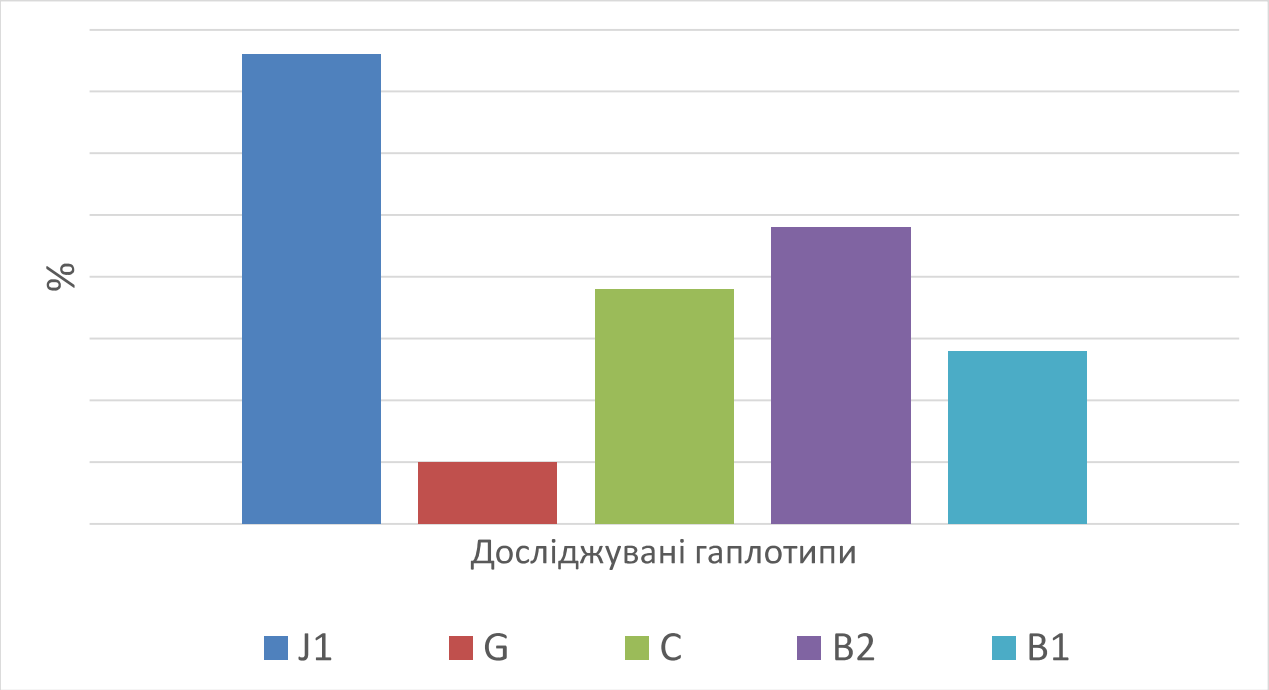

Рисунок 3.7. Концентрація мітохондріальних гаплотипів, визначених серед вибірки племінних свиней великої білої породи

Попередніми дослідженнями, серед свиней великої білої породи України було знайдено сім мітохондріальних гаплотипів, що зустрічалися з різною частотою. З найбільшою частотою зустрічалися гаплотипи ***G*** (14,1%), ***J1*** (13,3%) і ***N*** (5,91%); значно рідше − гаплотипи ***A*** (0,3%), ***B1*** (1,9%), ***C*** (9,2%) і ***L*** (2,2%). Таким чином, дослідження показали, що мітохондріальні гаплотипи ***B1, C, G*** та ***J1*** визначені у вибірці племінних свиней великої білої породи ТОВ «Нива Переяславщини» характерні для свиней великої білої породи, окрім гаплотипів ***B2***. Важливе значення для відновлення миргородської породи свиней є існування у стаді свиней великої білої породи тварин які мають притаманний миргородській породі гаплотип ***B1***, а саме тварини з номерами UA800000017570, UA8846455, UA8837932.

Може бути кілька пояснень присутності в гаплогрупі великої білої породи України гаплотипів, не характерних для чистопородних свиней англійської великої білої породи. Перш за все, це тривалість розведення свиней великої білої породи України. До 1970 року в Україні свиней великої білої породи розводили в 11 племінних заводах, 9 племінних господарствах і 48 племінних колгоспних фермах. Кількість чистопородних кнурів великої білої породи у 1973 році становила 98,3% від загального числа кнурів цієї породи, а свиноматок - 38,9% [100]. Таким чином, можливо, що серед великої білої породи України збереглися гаплотипи помісних свиней ***A, B1, B2.***

3.4. Економічна ефективність

Метод розведення за лініями вважається вищою формою селекційно-племінної роботи з породою. Генеалогічні лінії вважаються формальними не вирішують питань фенотипічної та генотипічної диференціації порід. Для усунення цього недоліку шляхом забезпечення структуризації породи по материнським генетичним лініям (родинам), в Інституті свинарства був розроблений і запатентований простий спосіб визначення генетичних маркерів, здатних стійко успадковуватися по материнській лінії протягом багатьох поколінь.

Цей спосіб передбачає рестриктний аналіз фрагменту найбільш варіабельного, некодуючого регіону мітохондріального геному свині, попередньо ампліфікованого за допомогою полімеразної реакції. Рестриктний аналіз за допомогою ендонуклеази Tas I (↓aatt), або її аналога дозволяє визначати 16 мітохондріальних гаплотипів, які дозволяють чітко диференціювати материнські генетичні лінії свиней.

Перевага методу визначення мітохондріальних гаплотипів свиней: не потребує визначення нуклеотидної послідовності, сиквенсу. Дана розробка впроваджена у науково-виробничу практику у племзаводі ДП «ДГ «ім. 9 січня» Інститут свинарства і АПВ НААН України, при використанні даного

методу для дослідження 25 голів свиней, економічний ефект складає 4950 грн.

Економічний ефект від впровадження даної розробки складає:

Дослідження методом сиквенування однієї тварини складає 250 грн, для дослідження 130 тварин необхідно булоб витратити 25*250=6200 грн. Дослідження однієї тварини даним методом складає 50 грн, для дослідження 130 тварин було витрачено 25*50=1250 грн.

Таким чином економічний ефект складає 6200-1250=4950 грн.

ВИСНОВКИ

1. Сучасні реалії вимагають нових підходів до ведення племінної роботи, не заперечуючи водночас і традиційні методи для створення нових і консолідацію вже існуючих порід сільськогосподарських тварин.
2. Генетичні технології засновані на молекулярно-генетичних методах в селекції свиней відкривають великі можливості для розвитку галузі свинарства. ДНК-типування тварин за допомогою ДНК-маркерів надають найточнішу інформацію про генетичний потенціал дослідженої тварини, а завдяки різноманіттю молекулярно-генетичних маркерів та підходів сфера їх застосування дуже широка.
3. З використанням сучасних молекулярно-генетичних технологій розроблено ДНК-маркерні системи генотипування по локусах, які контролюють господарські і біологічні ознаки свиней.
4. ПЛР-ПДФ аналіз поліморфізму ділянки D-петлі мітохондріальної ДНК у вибірці племінних свиней великої білої породи у ТОВ «Нива Переяславщини» визначив 5 мітохондріальних гаплотипів.
5. За результатами проведених досліджень встановлено, що виявлені мітохондріальні гаплотипи ***B1, C, G*** та ***J1*** є характерними для свиней великої білої породи, мітохондріальні гаплотипи ***B2 -*** характерні для свиней великої чорної породи, а виявлений гаплотип ***B1*** притаманний миргородській породі.
6. Дані поліморфізму мітохондріального геному в якійсь мірі можуть усунути сформоване формальне відношення до генеалогічних родин у свинарстві та спланувати селекційні заходи впорядкування структури породи.

ПРОПОЗИЦІЇ

Визначення мітохондріальних гаплотипів свиней може бути використане при розведенні, удосконаленні існуючих та створенні нових порід, типів, родин свиней, для захисту інтелектуальної власності селекціонерів, а також при дослідженні біорізноманітності виду Sus scrofa.