

## **ЖЫВЁЛАГАДОЎЛЯ І ВЕТЭРЫНАРНАЯ МЕДЫЦЫНА**

УДК 636.4.579.252.58

*И. П. ШЕЙКО, Н. А. ЛОБАН, О. Я. ВАСИЛЮК*

### **РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В СВИНОВОДСТВЕ БЕЛАРУСИ**

*Институт животноводства НАН Беларуси*

*(Поступила в редакцию 10.05.2004)*

В настоящее время, в связи с развитием молекулярной генетики, появилась возможность идентификации генов, напрямую или косвенно связанных с хозяйственно-полезными признаками. Выявление предпочтительных, с точки зрения селекции, вариантов таких генов (маркер-зависимая селекция) у свиней позволяет, наряду с отбором по фенотипу, проводить селекцию непосредственно на уровне ДНК, т. е. по генотипу.

Маркер-зависимая селекция имеет ряд преимуществ перед традиционной селекцией. Она не учитывает изменчивость хозяйственно-полезных признаков, обусловленную внешней средой, делает возможной оценку животных в раннем возрасте, независимо от пола и, в результате, повышает эффективность селекции.

В настоящее время разработаны методики, позволяющие определить спектр генов-кандидатов, полиморфные варианты которых оказывают прямое или косвенное влияние на развитие признаков продуктивности свиней. В качестве генетических маркеров, представляющих практический интерес для свиноводства, рассматривались: рианодинновый рецептор (Ryr1) — ген-кандидат чувствительности животных к стрессам; эстрогеновый рецептор (ESR) — плодовитости свиней; рецептор E. coli — чувствительности к колибактериозу; связанный белок жирных кислот (H-FABP) — маркер содержания внутримышечного жира [5].

Целью наших исследований было изучение полиморфизма генов рецепторов Ryr1, ESR, E. coli, H-FABP и их влияние на признаки продуктивности и резистентности свиней плановых пород Беларуси.

При этом решались следующие задачи:

- 1) оценка частотности аллелей в генах;
- 2) изучение влияния полиморфизма генов на резистентность и продуктивность свиней;
- 3) использование методов маркер-зависимой селекции в селекции свиней.

Исследования проводились в условиях племязаводов, селекционно-гибридных центров и свинокомплексов на всех половозрастных группах свиней в различных регионах Беларуси. У опытных животных отбирали пробы генетического материала с ушной раковины, из которых в условиях лаборатории молекулярной генетики (ВИЖ, Россия) были выделены и оптимизированы тест-системы для анализа полиморфизма генов методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР) [7].

**Рианодинновый рецептор (Ryr1).** Увеличение мясности туш свиней способствует ряду негативных явлений. Наиболее распространенными из них является стрессовый синдром свиней (PSS), приводящий к большим экономическим потерям в результате снижения продуктивности, повышения смертности животных и резкому ухудшению качества свинины. Повышение температуры тела как основной признак заболевания и гибели животных был назван «синдромом злокачественной гипертермии» [3].

В настоящее время установлено, что чувствительность к злокачественной гипертермии вызывается точковой мутацией гена рианодиннового рецептора Ryr1. Открытие данной мутации позволило разработать молекулярно-генетический тест, позволяющий абсолютно точно идентифицировать генотипы свиней (NN-стрессустойчивые не носители: Nn-стрессустойчи-

вые скрытые носители, pp-стрессчувствительные носители) [6]. Данный метод исключает сомнительную реакцию и его проведение возможно на всех половозрастных группах животных и, что особенно важно, при отборе поросят на начальном этапе селекции.

Результаты таких исследований по генотипическому тестированию на стресс-фактор некоторых плановых пород РБ по вариантам рианодинового гена-рецептора представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Частота аллелей и генов рианодинового (Ryг1) гена рецептора у свиней плановых пород РБ

Порода	Число голов	Частота гена,%		Частота аллелей	
		NN	Nn	N	n
Крупная белая	431	98,6	1,4	0,99	0,01
Белорусская черно пестрая	104	94,3	5,7	0,97	0,03
Белорусская мясная	55	98,2	1,8	0,99	0,1
Ландрас	48	59,2	40,8	0,80	0,20
Эстонская беконная	45	95,6	4,4	0,98	0,02
Крупная белая × белорусская мясная	77	97,0	3,0	0,98	0,02

Животные в гомозиготном рецессивном состоянии (генотип-pp) в наших исследованиях выявлены не были. Вероятно, это связано с начальным этапом проявления данной мутации в исследуемых популяциях и гибелью этих животных в эмбриональный и ранний постэмбриональный периоды.

Стрессчувствительность изучалась на 760 головах свиней всех половозрастных групп. Анализ показал, что наиболее высокий процент особей, несущий чувствительный к стрессам ген-рецептор, отмечен у свиней породы ландрас (40,8% гетерозиготного генотипа Nn).

Таким образом, низкая частота встречаемости, а также отсутствие чувствительных к стрессам животных с генотипом-pp у основной плановой породы Беларуси — крупной белой указывает, что нет необходимости проведения полной молекулярной генной диагностики стрессовой чувствительности. С целью исключения стрессчувствительных животных тут достаточно проведения диагностики среди используемых и ремонтных хряков.

При селекции материнских пород свиней (крупная белая, белорусская черно-пестрая) необходима полная элиминация животных-носителей, а по специализированным мясным породам проводить подбор с целью нивелирования отрицательных последствий мутации.

**Эстрогеновый рецептор (ESR).** Прямая селекция свиней на плодовитость характеризуется малой эффективностью из-за низкой наследуемости признака и ограниченного полом проявления. В этой связи использование в качестве генетического маркера гена эстрогенового рецептора (ESR), связанного с воспроизводительными качествами свиней, представляет практический интерес с точки зрения селекции [2].

Полиморфизм данного гена обусловлен наличием двух аллелей — А и В. Исследования на 428 голов свиней всех категорий по вариантам эстрогенового рецептора представлены в табл. 2.

Т а б л и ц а 2. Частоты аллелей и генотипов эстрогенового гена рецептора у свиней плановых пород РБ

Порода	Число голов	Частоты генотипов, %			Частоты аллелей	
		АА	АВ	ВВ	А	В
Крупная белая	203	31,4	40,4	28,2	0,52	0,48
Белорусская черно-пестрая	26	76,9	19,2	3,9	0,87	0,13
Белорусская мясная	25	76,0	24,0	0,0	0,88	0,12
Эстонская беконная	133	81,9	13,5	4,6	0,89	0,11
Ландрас	15	13,3	20,0	6,7	0,83	0,17
Дюрок	26	88,5	0,0	11,5	0,89	0,11

Согласно данным табл. 2, частота встречаемости презумптивно предпочтительного с точки зрения многоплодия аллеля В достаточно низка и максимальна у свиней крупной белой породы — 0,48. У остальных пород она варьировалась в диапазоне 0,11—0,17.

Исследование влияния генотипа ESR на плодовитость было выполнено на 70 многопородных свиноматках в ЗАО «Нарцисово». По генотипам свиноматок многоплодие было: генотип АА (37 маток — 9,51 поросят); АВ (12 маток — 9,92); ВВ (21 матка — 10,57 поросят ( $P < 0,001$ )). Таким образом, было выявлено достоверное превосходство по многоплодию животных, несущих аллель В над свиноматками с аллелем А.

Полученные результаты выявили положительную и достоверную закономерность повышении продуктивности и, в случае подтверждения их на большем поголовье животных, эстрогеновый рецептор может быть рекомендован в качестве генетического маркера многоплодия свиней, а также при селекции на повышение воспроизводительных качеств животных.

**Е. Coli рецептор (ECR F 18).** Колибактериоз — остро протекающее инфекционное заболевание молодняка животных, в частности, поросят, сопровождающееся диареей и высокой летальностью. Возбудитель — кишечная палочка *E. Coli*, которая продуцирует адгезивные антигены, способные прикрепляться к чувствительным клеткам макроорганизма. Из специфических адгезинов при колибактериозе поросят наиболее важную роль играет ген F 18 [4, 8]. Таким образом, в качестве возможного генетического маркера, представляющего практический интерес в свиноводстве, а также для повышения резистентности и сохранности поросят можно рассматривать ген рецептора *E. Coli* F 18. Выявлен полиморфизм этого гена, причиной которого является точковая мутация А (G. Поросята, имеющие генотип GG или AG, предположительно являются восприимчивыми к колибактериозу, а генотип AA — устойчивыми [6].

Анализ результатов генетических тестов некоторых плановых пород РБ позволил выявить частоты встречаемости генотипов и аллелей А и G гена ECR F18 (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Частота встречаемости генотипов и аллелей гена ECR F18 у свиней плановых пород РБ

Порода	Число голов	Частоты генотипов, %			Частоты аллелей	
		AA	AG	GG	A	G
Крупная белая	69	7,3	39,1	53,6	0,27	0,73
Белорусская черно-пестрая	20	10,0	35,0	55,0	0,27	0,73
Белорусская мясная	30	16,0	34,0	50,0	0,33	0,67
Эстонская беконная	34	8,8	32,4	58,8	0,25	0,75
Ландрас	44	11,2	24,9	63,9	0,24	0,76

При анализе результатов исследований на 197 головах свиней выяснилось, что частота встречаемости мутантного аллеля G у различных пород относительно высока: 67—76%.

В условиях свинокомплекса «Дражно» Витебской области были проведены исследования на 54 многопородных матках. Выявлено, что заболеваний колибактериозом полученных от свиноматок поросят в зависимости от их генотипов доказанных клинических случаев было: генотип AA (121 поросенок) — 5 случаев (4,1%); генотип AG (278 голов) — 18 (6,5%); генотип GG (432 поросенка) — 36 случаев (8,3%). Таким образом, встречаемость заболевания у животных с генотипом AA была в 1,98 раза ниже, чем у потомства свиноматок с генотипом GG, что позволяет говорить о наличии тенденции влияния генотипов гена ECR F18 на проявления колибактериоза у поросят.

Также было отмечено достоверное ( $P < 0,05$ ) увеличение количества поросят при отъеме на 9,9%; отъемной массы гнезда — на 4,5 кг и сохранности поросят — на 5,7% у животных с генотипом AA по сравнению с GG.

Выявленные закономерности требуют подтверждения не только на помесных, но и на чистопородных свиньях, а также на большем поголовье. Однако уже на данном этапе можно предположительно рассматривать ген ECR F18 как генетический маркер, определяющий предрасположенность свиней к колибактериозу и использовать его в селекции для повышения резистентности и сохранности поросят.

**Связанный белок жирных кислот (H-FABP).** Ген связанного белка жирных кислот (H-FABP) рассматривается в качестве маркера содержания внутримышечного жира у свиней. Выявлено три типа аллельного полиморфизма: А; D и H. Исследованиями установлено, что предпочтительным с точки зрения селекции является генотип aaddHH [1].

Можно предположить, что ген H-FABP оказывает косвенное влияние на некоторые показатели продуктивности откармливаемого молодняка свиней, такие как толщина шпика, прирост живой массы и др.

Анализ результатов генетических тестов крупной белой и белорусской мясной пород позволил выявить частоты встречаемости аллелей генотипов D и H гена H-FABP (табл.4). По аллелю А полиморфизма выявлено не было. Все животные имели генотип AA.

Т а б л и ц а 4. Частоты встречаемости генотипов и аллелей системы Н-FABP свиней крупной белой и белорусской мясной пород

Породы	Число голов	Частоты генотипов, %			Частоты аллелей	
		DD	Dd	dd	D	d
Крупная белая	102	13,7	43,2	43,1	0,35	0,65
Белорусская мясная	63	3,2	62,0	34,8	0,34	0,66
		НН	Нн	hh	Н	h
Крупная белая	88	78,4	14,8	6,8	0,86	0,14
Белорусская мясная	63	71,4	22,2	6,4	0,83	0,17

Исходя из представленных в таблице данных, частота встречаемости презумптивно предпочтительного генотипа dd у свиней крупной белой породы составила 43,1%, белорусской мясной — 34,8%, НН — 78,4 и 71,4% соответственно. Нежелательные аллели D и h у изучаемых пород присутствовали примерно в одинаковой степени: 0,35—0,34 и 0,14—0,17% соответственно.

Исследования сочетаний генотипов как у крупной белой, так и белорусской мясной породы выявило 4 из 9 возможных комбинаций. В табл. 5 представлены данные взаимосвязи сочетаний генотипов по Н-FABP с откормочной и мясной продуктивностью свиней крупной белой породы.

Т а б л и ц а 5. Результаты контрольного откорма свиней крупной белой породы в зависимости от сочетаний генотипов по Н-FABP

Сочетание генотипов	Откормочные качества		Мясные качества				
	затраты корма, к. ед.	среднесуточный прирост, г	длина туши, см	толщина шпика, мм	масса окорока, кг	площадь мышечного глазка, см <sup>2</sup>	убойный выход, %
dd НН	3,29±0,16	753±10,2*	97,9±0,34	25,3±0,83*	11,0±0,11	31,8±0,72*	67,5±0,23
Dd НН	3,52±0,08	744±16,1*	96,7±0,44	25,6±0,83*	10,8±0,16	29,7±0,64*	67,0±0,30
Dd hh	4,04±0,29	653±30,0	95,7±2,85	30,0±1,32	10,6±0,58	28,0±0,48	66,0±0,27
Dd Нн	3,21±0,2	726±27,4	97,8±1,2	28,0±1,7	10,5±0,03	28,7±1,53	66,8±0,55

П р и м е ч а н и е. Разница между сочетаниями Dd hh — dd НН и Dd hh достоверна при  $x^2$ - $P < 0,05$ .

Анализ сочетаний генотипов по Н-FABP указывает на статистически достоверную тенденцию к увеличению прироста живой массы, снижению толщины шпика и повышению площади «мышечного глазка» у животных, несущих предпочтительные сочетания генотипов ddНН и DdНН по сравнению с генотипом Ddhh. Среднесуточный прирост живой массы у них был выше на 15,3 и 13,9% ( $P < 0,05$ ), толщина шпика — ниже на 15,7 и 14,7% ( $P < 0,05$ ) по сравнению с сочетанием Ddhh. Отмеченная тенденция распространяется также на все остальные показатели откормочной и мясной продуктивности свиней крупной белой породы. Животные, несущие гетерозиготные генотипы Dd Нн, занимали промежуточное положение.

Аналогичную тенденцию можно отметить и по генотипам D-системы, а также на откармливаемом молодняке белорусской мясной породы. Отмечалась значительная вариация признаков мясо-откормочных качеств ( $Cv = 8,5—14,7\%$ ) у молодняка свиней крупной белой породы по генотипам, что указывает на резервы в селекции.

Таким образом, выявленные закономерности требуют подтверждения не только на большем поголовье животных, но и на других породах свиней. Однако уже сейчас можно предположительно рассматривать ген Н-FABP как генетический маркер, определяющий некоторые откормочные и мясные качества свиней крупной белой и белорусской мясной пород. Необходимо осуществлять подбор пар по генотипам, что позволит значительно повысить эффект селекции по мясо-откормочным качествам.

**Заключение.** Использование методов молекулярной генной диагностики позволит перевести селекцию свиней на качественно новый уровень, сделает возможным улучшение пород животных, основываясь на их истинном генетическом потенциале, сделает возможным ускорить племенную оценку и получить объективный прогноз продуктивности при подборе, и, в конечном результате, станет неотъемлемой частью селекционной работы.

## Литература

1. Арсиенко Р. Ю., Гладырь Е. А. // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: Мат. межд. научн. конф. Дубровицы. 2002. С. 94–96.
2. Волкова П. В., Гладырь Е. А., Лобан Н. А., Зиновьева Н. А. // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: Мат. межд. научн. конф. Дубровицы. 2003. С. 92–95.
3. Давыдов А. Ф. // Сб. Тр. Харьковского СХИ. 1985. С. 54–60.
4. Дворкин Г. Л., Гутковский А. А. Колибактериоз телят и поросят // Обзорная информация. Мн., БелНИИТИ. 1989. С. 3–22.
5. Зиновьева Н. А., Гладырь Е. А. // Современные достижения и проблемы биотехнологии сельскохозяйственных животных: Мат. межд. научн. конф. Дубровицы. 2002. С. 44–55.
6. Зиновьева Н. А., Гладырь Е. А., Эрнст Л. К., Брем Г. // ВИЖ. 2002. С. 53–71.
7. Зиновьева Н. А., Попов А. В., Эрнст Л. К. и др. Методические рекомендации по использованию метода полимеразной цепной реакции в животноводстве. Дубровицы. 1998.
8. Кирьянов Е. А., Больных А. Т. Колибактериоз животных и его профилактика. Уссурийск, 1986.

*SHEIKO I. P., LOBAN N. A., VASILUK O. YA.*

### **DEVELOPMENT OF METHODS OF MOLECULAR GENE DIAGNOSTICS AND THEIR APPLICATION IN PIG BREEDING OF BELARUS**

#### **Summary**

Number of gene-candidates has been revealed. Their polymorphous variants influence onto development of signs of pig production. Datum on frequency of occurrence of alleles and gene-types of genes: receptor (Ryr 1), oestrogen receptor (ESR), receptor E. Coli (ECR F 18) and bound proteins of fat acids (H-FABP) in different pedigrees of pigs of Belarus. Correlation between polymorphous variants of these genes with economy-effective signs of the pigs: protection to stress, prolificacy, temps of growing and quality of meat.