

УДК 575.162

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДНК-МАРКЕРОВ В СЕЛЕКЦИИ СВИНЕЙ ЗАВОДСКОГО ТИПА КМ-1

Гришкова А.П., Барков Д.А.

*ФГАОУВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет»,  
Юргинский технологический институт, Юрга, e-mail: barkoff82@tpu.ru*

Впервые проведены исследования генотипической структуры современной популяции животных кемеровского заводского типа мясных свиней (КМ-1) по генам ESR и RYR-1. Исследования по выявлению полиморфизма по гену RYR-1 у свиней типа КМ-1 показали, что из 87 голов мутация в гене RYR-1 выявлена у одного животного, что составляет 1,1%. Это указывает на высокую пластичность и стрессустойчивость животных. Так, частота мутантного гена RYR-1<sup>n</sup> была равна 0,0114, что значительно ниже, чем например в породе СМ-1. Установлено, что гетерозиготные хряки генотипа AG гена ESRF/FUT1, более устойчивые к колибактериозу, имели более высокую энергию роста, а свиноматки с этим генотипом лучшую сохранность поросят по сравнению с животными носителями генотипа GG.

**Ключевые слова:** ДНК-маркеры, гены, продуктивность свиней, стресс-чувствительность, колибактериоз

## THE USE OF DNA-MARKERS IN BREEDING PIGS FACTORY TYPE KM-1

Grichkova A.P., Barkov D.A.

*Tomsk Polytechnic University Yurga Technological Institute, Yurga, e-mail: barkoff82@tpu.ru*

That is the first time the research has been carried out into the genotypic structure of present-day animal population of Kemerovo bride-type meat hogs (KM-1) according to the genes ESR and RYR-1. Investigation aimed at polymorphism identification according to RYR-1 gene of KM-1 hogs showed that only one animal among 87 head had mutation in RYR-gene, it makes 1,1%. This fact emphasizes a high level of plasticity and resistance to stress of animals. The frequency of mutated RYR-1<sup>n</sup> gene was 0,0114; it is considerably lower than that in CM-1 strain. It has been stated that heterozygous hogs of AG genotype in ESRF/FUT1 gene are more resistant to colibacillosis, have higher growing power, and sows with this genotype keep piglets better than animals – GG genotype carriers.

**Keywords:** DNA markers, genes, productivity pigs, stress sensitivity, colibacteriosis

В современных экономических условиях огромное значение приобретает производство высококачественной сельскохозяйственной продукции, в том числе свинины. Реализация данной задачи возможна только при наличии высокого генетического потенциала животных, формирующегося непрерывной селекционной работой.

К наиболее перспективным направлениям в современной селекции сельскохозяйственных животных относятся биотехнологические исследования, включая ПЦР-анализ полиморфизма генов, так или иначе сопряженных с хозяйственно полезными признаками и жизнеспособностью животных [3].

Изучению стрессов у свиней, их генетической сущности и селекции на устойчивость к неблагоприятным факторам посвящены многие работы [2, 7].

Из всех факторов, связанных с технологическими процессами, особенно сильным и неизбежным стрессом является отъем поросят от матерей. Ранний отъем поросят, применяемый в промышленной технологии, приводит к высокому их падежу (0,4–0,5%), так как после отъема возникает сильная стресс-реакция, в результате которой образуются язвы на слизистой желудочно-кишечного тракта [1].

Длительные стрессовые ситуации приводят к тахикардии, очаговому цианозу кожи, повышению температуры тела до 42–45 °С и молочному ацидозу [8]. При прогрессировании патологического процесса развивается тахикардия с последующей остановкой сердца в результате резкой гиперкалиемии на фоне гипоксии и метаболических нарушений [9]. После убоя таких животных проявляется синдромы бледной, мягкой, эксудативной PSE (Pale Soft Exudative) или темной, жесткой, сухой свинины DFD (Dark Firm Dry). Было показано, что столь серьезный дефект связан с аномальным изменением рН скелетной мускулатуры после убоя [10].

Как метод прогнозирования стресс-чувствительности свиней используют тесты, характеризующие высшую нервную деятельность, креатинкиназный тест, метод «кризис отъема», метод локального адаптационного синдрома, содержание в шпике линоленовой кислоты, реакция на этанол.

Проблема стрессов в свиноводстве стоит особенно остро, так как при промышленной технологии их избежать невозможно. Поэтому исследования, связанные с выявлением свиней, устойчивых к стрессу, остаются актуальными. Доказано, что чувствительность к стрессам – наследственно обусловленный порок свиней, который

чаще всего выявляется у свиней мясных пород. ПЦР-ПДРФ анализ позволяет выявлять всех носителей мутантного гена и выводить их из селекционного процесса, что обеспечивает более высокую сохранность поросят.

Исследования проведены в хозяйстве – оригинаторе по чистопородному разведению кемеровского заводского типа мясных свиней КМ-1 – ООО СХО «Заречье» Кемеровской области, лаборатории биотехнологии СибНИПТИЖ СО РАСХН.

Объектом исследований явились хряки-производители, свиноматки, поросята группы 0-2, ремонтный молодняк и подсвинки на контрольном откорме.

Полиморфизм структурных генов выявляли с помощью реакции ПЦР. Выделение ДНК проводили по методике, предложенной лабораторией «Медиген». Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в объеме 25 мкл. Исследования полиморфизма гена RYR-1 проводили по методике, описанной Калашниковой и др. [6]. Для выявления гена RYR-1 применяли два олигонуклеотидных праймера:

RYR 56: 1 5'-GTGCTGGATGTCCTGTGT TCCCT – 3'

RYR 56: 25'-GTGGTGACATAGTTGATGAGG TTTG – 3'

Режим амплификации: «горячий старт» – 94 °С – 6 мин; денатурация – 94 °С – 1 мин., отжиг – 60 °С – 1 мин, элонгация – 72 °С – 1 мин; достройка матрично-праймерных комплексов проводится при 72 °С – 5 мин.

Концентрацию и специфичность амплификата оценивают электрофоретическим методом в 2% агарозном геле. Визуализируется амплифицированный фрагмент RYR-1 с помощью трансиллюминатора в проходящем УФ – свете. Длина амплифицированного фрагмента составляет 134 п.н. Полученный фрагмент подвергали рестрикции рестриктазой *Hin6I* с соответствующим буфером.

Наличие на геле двух полос длиной 84 п.н. и 50 п.н. соответствовало гомозиготному генотипу NN; одной яркой, четкой полосы и двух менее ярких длиной 134, 84, 50 п.н. – гетерозиготный генотип Nn; одной яркой длиной 134 п.н. – гомозиготный генотип – nn.

Полимеразную цепную реакцию для выявления полиморфизма гена ESR F18/FUT1 проводили с использованием следующей методики. После начальной денатурации при температуре 95 °С в течение 5 минут выполняли 35 циклов амплификации в следующем температурном режиме: 95 °С – 1 мин., 66 °С – 1 мин., 72 °С – 1 мин. Для амплификации фрагмента гена ESR F18/FUT1 использовали праймеры ESR 1 и ECR 2

ESR 1–5' CGC CAC CTC TGT CTG ACC TT – 3'

ESR 2–5' AGG AGC GTG CCT GTC TAC CTC – 3'

Полученный амплификат подвергали гидролизу с рестриктазой *BSTNI* с последовательностью узнавания GCG↓C. Отсутствие рестриционного сайта соответствует аллелю А, в то время как его наличие – аллелю G.

Для анализа амплифицированных фрагментов ДНК и продуктов рестрикции использовали метод гель-электрофорез. Электрофоретическое разделение проводили при 120–135 В в 1,8–2%-ном агарозном геле в буфере TAE.

Полученные фрагменты, согласно методике соответствовали:

378 п.н. – AA, 291 и 87 п.н. – GG, 378, 291 и 87 – AG.

Исследованиями как отечественных, так и зарубежных учёных установлено, что более чувствительны к стрессам свиньи пород пьетрен и ландрас и менее подвержены стрессам свиньи крупной белой, йоркшир, дюрок. Исследования, проведенные на современном молекулярном уровне показали, что из 87 животных заводского типа КМ-1 частота мутации в гене RYR-1 составляет 0,0057 (табл. 1).

Следует обратить внимание на тот факт, что две популяции свиней – КМ-1 и новый тип породы СМ-1 (сибирский), разводимые в одинаковых условиях Западной Сибири, значительно различаются по частоте стрессустойчивости. Частота мутантного гена у животных типа КМ-1 получена в несколько раз ниже, чем в породе СМ-1. Среди исследованных животных КМ-1 не выявлено ни одной гомозиготы RYR-1<sup>n</sup>.

Таблица 1

Структура популяций свиней по локусу RYR 1

| Популяция | n   | Частота генотипов RYR1 |        |     | Частота мутантного гена RYR 1 <sup>n</sup> |
|-----------|-----|------------------------|--------|-----|--------------------------------------------|
|           |     | N/N                    | N/n    | n/n |                                            |
| КМ-1      | 87  | 0,989                  | 0,0114 | 0   | 0,0057 + 0,0001                            |
| СМ-1 [27] | 113 | 0,912                  | 0,088  | 0   | 0,046 + 0,0002                             |

Это означает, что при чистопородном разведении заводского типа КМ-1 по ряду количественных признаков сформирована уникальная в отношении стрессустойчивости популяция животных.

Не менее важной проблемой в свиноводстве остается сохранение молодняка, причиной гибели которого чаще всего бывает диарея. Как известно, возбудителем заболевания является кишечная палочка *E.colli*. Наряду с вакцинацией маток, в настоящее время разработан метод анализа вариантов гена *ESRF18/FUT1*, носители некоторых генотипов которого обладают более высокой устойчивостью к колибактериозу. Нашими исследованиями установлено, что генотип АА у свиней заводского типа КМ-1 встречается в 5 раз меньше, чем генотип GG, а аллель А в два раза меньше, чем альтернативный G (табл. 2). Около половины животных имеют гетерозиготный генотип AG.

Устойчивость или чувствительность к колибактериозу может оказывать влияние

на проявление хозяйственно полезных признаков, особенно на сохранность поросят.

Установлено, что наличие генотипов гена *ESRF18/FUT1* не оказало влияния на изучаемые показатели свиноматок, за исключением сохранности поросят в гнезде к отъёму (табл. 3). У животных с генотипом AG сохранность поросят была выше на 10,1% ( $P < 0,01$ ), чем у носителей генотипа GG.

Аналогичные исследования по влиянию генотипов гена *ESRF18/FUT1* на продуктивность хряков указывают на то, что гетерозиготные хряки с генотипом AG, устойчивые к колибактериозу, имели более высокую энергию роста и достигали 100 кг на 13,6 дней раньше ( $P < 0,01$ ), чем производители с альтернативным генотипом, где присутствует нежелательный аллель G (табл. 4).

В свиноводстве за рубежом широко используется анализ на наличие нежелательной мутации в гене *RYR-1*, ответственной за предрасположенность животных мясных пород к злокачественной гипертермии.

Таблица 2

Генотипическая структура свиней КМ-1 по гену *ESR*

| Генотип | n  | Частота генотипа наблюдаемая, % | Частота генотипа ожидаемая, % | Частота аллеля | $\chi^2$ |
|---------|----|---------------------------------|-------------------------------|----------------|----------|
| AA      | 4  | 8,0 ± 3,83                      | 10,2 ± 4,28                   | A – 0,32       | 1,06     |
| AG      | 24 | 48,0 ± 7,06                     | 43,5 ± 7,01                   | G – 0,68       |          |
| GG      | 22 | 44,0 ± 7,01                     | 46,2 ± 7,05                   |                |          |

Таблица 3

Продуктивность свиноматок с учётом генотипов гена *ESRF18/FUT1*

| Показатель                       | Генотип      |               |
|----------------------------------|--------------|---------------|
|                                  | GG           | AG            |
| Возраст достижения 100 кг, дней  | 176,2 ± 2,80 | 181,1 ± 2,61  |
| Толщина шпика, мм                | 23,0 ± 0,86  | 23,0 ± 0,54   |
| Длина туловища, см               | 125,9 ± 0,69 | 126,4 ± 0,67  |
| Многоплодие, гол.                | 10,1 ± 0,58  | 10,2 ± 1,22   |
| Молочность, кг                   | 54,6 ± 3,05  | 56,9 ± 2,30   |
| Масса гнезда в 2 месяца, кг      | 188,4 ± 7,46 | 196,4 ± 6,21  |
| Масса 1 поросёнка в 2 месяца, кг | 22,6 ± 1,01  | 22,6 ± 0,93   |
| Сохранность, %                   | 82,1 ± 2,32  | 92,0 ± 2,96** |

Таблица 4

Продуктивность хряков с учётом генотипов гена *ESRF18/FUT1*

| Показатель                      | GG             | AG           |
|---------------------------------|----------------|--------------|
| Возраст достижения 100 кг, дней | 179,7 ± 2,74** | 166,1 ± 2,26 |
| Толщина шпика, мм               | 21,6 ± 1,25    | 19,5 ± 0,65  |
| Длина туловища, см              | 129,6 ± 0,88   | 130,5 ± 1,37 |
| Многоплодие, гол.               | 8,9 ± 0,44     | 8,6 ± 0,48   |
| Масса 1 поросёнка, кг           | 22,1 ± 0,47    | 22,5 ± 0,59  |

Исследователями отмечено, что селекция свиней на улучшение мясных качеств приводит к снижению устойчивости к стрессам. По данным Н.А. Зиновьевой, более устойчивы к стрессу свиньи крупной белой породы [5]. Частота мутаций в этой породе находится в пределах 3,6–8,2%. Незначительное количество животных с мутацией этого гена обнаружено у свиней породы СМ-1 (5,3%), [4] в то же время у свиней крупной чёрной она выявлена у 13,6% животных. Хорошей устойчивостью к стрессам характеризуется ливенская порода. В породе СМ-1 в смежных поколениях зафиксирована единичная встречаемость гетерозиготных носителей мутации и полное отсутствие гомозигот по рецессивному аллелю.

Проведённые исследования показали что, с целью планирования селекционного процесса, контроля стрессустойчивости и здоровья животных, а также максимального использования производителей, имеющих лучшее сочетание у потомства селекционируемых и других хозяйственно полезных признаков, таких как высокая скороспелость и конверсия корма, тонкий шпик необходимо осуществлять генетический мониторинг в популяциях племенных хозяйств по свиноводству с использованием ген маркёров – RYR-1<sup>n</sup> и ESRF18/FUT1.

#### Список литературы

1. Бузлама В.С. Стресс в промышленном свиноводстве // Сельское хозяйство за рубежом. – 1976. – № 8. – С. 13–15.
2. Гончаренко Г.М. Генетическая структура популяций сельскохозяйственных животных Западной Сибири и использование маркёров в селекции: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / Г.М. Гончаренко. – Новосибирск, 2009. – 38 с.
3. Гончаренко Г.М., Бекенев В.А., Акулич Е.Г., Гришина Н.Б., Горячева Т.С., Кононенко Е.В., Фролова В.И. Феногенетический анализ маточного поголовья свиней крупной белой породы / Г.М. Гончаренко и др. // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2011. – № 9–10. – С. 66–72.
4. Гришкова А.П. Использование генетических маркёров в оценке продуктивности свиней заводского типа КМ-1 / А.П. Гришкова, Г.М. Гончаренко и др. // Зоотехния – 2008 – № 10.
5. Зиновьева Н.А. Перспективы использования молекулярной геномной диагностики / Н.А. Зиновьева, Е.А. Гладырь // ДНК-технологии в клеточной инженерии и маркировании признаков сельскохозяйственных животных: междунар. конф. / ВИЖ. – Дубровицы, 2001. – С. 44–49.
6. Калашникова Л.А. ДНК – технологии оценки сельскохозяйственных животных / Л.А. Калашникова, И.М. Дунин, В.И. Глазко, Н.В. Рыжова, Е.П. Голубина // Лесные Поляны: Изд-во ВНИИплем, 199. – 148 с.
7. Князев С.П. Популяционно-генетические особенности иммунореактивности и стрессчувствительности свиней / С.П. Князев, К.В. Жучаев, В.В. Гарт, В.А. Петухов, И.И. Гудилин // Генетика. – 1995 – Т. 31, № 3. – С. 400–404.
8. Population Genetic Peculiarities of Immune Response and Stress Resistance in Pigs Knyazev S.P., Zhuchayev K.V., Petukhov V.L., Nezavitin A.G. Russian Journal of Genetics. – 1995. – Т. 31, № 3. – P. 347–350.
9. Плященко С.И. Стрессы сельскохозяйственных животных / С.И. Плященко, В.Т. Сидоров. – М.: Агропромиздат, 1987. – 192 с.
10. Bell C., Kain Z. The pediatric Fnesthesia Handbook N // 2 ind Edition – St.- Louis: Mosby- Year Book. – 1997. – P. 485–500.
11. Wismer-Pedersen J. Quality of pork in relation to rate of pH change post mortem // Food Research, 1959. – Vol. 24. – P. 711–727.