

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ СВИНЕЙ УКРАЇНСЬКОЇ М'ЯСНОЇ ПОРОДИ ХАРКІВСЬКОГО ТИПУ

О. В. Драган, кандидат сільськогосподарських наук
Інститут сільського господарства степової зони НААН України

В статті викладені експериментальні дані вивчення молекулярно-генетичних особливостей свиней харківського типу української м'ясної породи.

Ключові слова: популяція, свині, генофонд, молекулярно-генетичні маркери ДНК, локуси, мік-росателіт.

Прискорення темпів інтенсифікації галузі свинарства за рахунок селекції з використанням молекулярно-генетичних маркерів може суттєво поліпшити забезпечення продовольчого ринку продуктами харчування. Освоєння сучасних методів ідентифікації тварин за допомогою генетичних маркерів дозволило перевести племінну роботу з поголів'ям на якісно новий рівень, а це в свою чергу надало можливість використовувати в селекційному процесі кількісні величини, характеристики конкретних генетичних систем (локусів і їхніх алелів) в генофондах популяцій або структурних елементів. Якщо до 80-х років минулого століття застосовували непрямі методи маркування генотипів тварин, які спиралися на пошук біл-кового поліморфізму шляхом електрофорезу або виявлення імуногенетичними методами лейкоцитарних і еритроцитарних антигенів, то з розробкою американським вченим Кері Мюллісом в 1983 р. методу полімеразної ланцюгової реакції – ПЛР (PCR-polymerase chain reaction) – з'явилась можливість як маркери використовувати особливості первісної структури ДНК [1].

Молекулярно-генетичні маркери значно розширюють можливості генетичного аналізу популяції, а це в свою чергу є надійним способом оцінки внутрішньої та міжпородної мінливості у різних видів сільськогосподарських тварин. Спираючись на це, дослідник має уявлення про генетичну структуру порід [2, 3, 4, 5]. Маркери можуть бути корисними при розробці сучасних систем розведення для характеристики відмінностей ліній і типів, а також при формуванні груп тварин в субпопуляції, крім того, дають можливість визначити напрямки роботи з ними, як проводити відбір тварин, що є носіями цінних генів засновника лінії [6, 7]. Такий напрямок використання маркерів допоможе селекціонерам не лише перетворити формальну лінію у заводську, продовжити вік існування генеалогічної структури, але й поліпшити бажані господарсько-цінні ознаки у нащадків, прискорити процес генетичної консолідації [8].

В. І. Глазко вважає [2], що використання молекулярно-генетичних маркерів дає змогу отримати інформацію про різний стан генів (алельних варіантів) і безпосередньо експериментально встановити, які варіанти окремих генів та генних комбінацій мають перевагу в групах організмів, які несуть бажаний комплекс ознак в конкретних умовах середовища. В подальшому така інформація дає можливість цілеспрямовано формувати генофонди з необхідним генним поєднанням. Генетичний аналіз ведеться не від ознаки до гена, а від нуклеотидних ланцюгів до ознаки за рахунок так званої генетики «навпаки».

Вченими різних країн ведеться інтенсивна робота з вивчення і використання генетичних маркерів у тваринництві, основою якої є метод ПЛР і різні його модифікації.

Суть методу ПЛР полягає в отриманні численних копій у циклічному ферментативному процесі фрагменту ДНК, що досліджується, за допомогою праймерів (синтетичних коротких, як правило, одноланцюгових фрагментів ДНК – олігонуклеотидів довжиною до 30 основ) з подальшим його вивченням шляхом електрофорезу.

Завдяки простоті, високій чутливості і відтворюваності метод ПЛР став одним з найбільш перспективних. Переваги ПЛР, порівняно з іншими методами дослідження ДНК, полягають у наступному:

- ДНК можливо екстрагувати з будь-якого, навіть деструктурованого біологічного матеріалу;
- для проведення аналізу достатньо «мікрокількості» виділеної ДНК;
- тривалість досліджень відносно коротка і становить 6–8 годин, а за деякими методами не більш 3 годин.

Головна особливість ПЛР – активне розширення, як результат – вже зроблено ряд модифікацій цього методу. З їх допомогою можливо вирішити багато завдань з дослідження ДНК.

З метою визначення особливостей генетичної структури свиней української м'ясної породи харківського типу була проведена оцінка генетичних особливостей за мікросателіт-ними маркерами ядерної ДНК із застосуванням методу ISSR-PCR.

Матеріалом для досліджень слугували тварини харківського типу, що належать ТОВ агропромисловий комплекс «Спаський» (Новомосковський район). Досліди тривали протягом 2002–2008 рр. Для оцінки генетичних особливостей свиней за мікросателітними маркерами ядерної ДНК спиралися на метод ISSR-PCR (Zietkiewicz Z.E et. all, 1994) з використанням праймера (AGC)₆ G. Молекулярно-генетичні дослідження ДНК свиней проводили в лабораторії генетики Інституту свинарства ім. О. В. Квасницького.

Як праймер використовували олігонуклеотид AGCAGCAGCAGCAGCAGC₆. Він був обраний як найбільш інформативний за результатами попередніх досліджень. Суміш для аналізу об'ємом 25 мкл включала: реакційний буфер – 2,5 мкл; MgCl₂ – 0,5 мкл; dNTP – 2,5 мкл; праймер (AGC)₆G – 0,5 мкл; виділену сольовим методом ДНК – 0,5 мкл; термостабільну полімеразу – 0,3 мкл і деонізовану воду до повного об'єму. Режим ПЛР – 2 хв. Початкова денатурація при 94⁰С; 30 сек – при 56⁰С; 2 хв – при 72⁰С; термічна елонгація – 4 хв при 72⁰С. Продукти ампліфікації розподіляли в 20% агарозному гелю в 1х TBE при 20–22 mA з наступним фарбуванням бромистим етидієм, з оглядом в ультрафіолетовому опромінюванні на транслюмінаторі і фотографуванням. Маркером молекулярної маси слугував 100 вр (Fermentas, Вільнюс).

Отриманий матеріал фотографували в УФ-світлі з відображенням електрофореграм, на основі яких створено матрицю детектованих ISSR – PCR полілокусних ДНК-маркерів свиней (табл.).

Використання праймера (AGC)₆G методом ISSR-PCR надало можливість ідентифікувати згідно з маркером молекулярної маси довжиною від 250 до 1000 пар нуклеотидів, фрагменти довжиною понад 1000 пар нуклеотидів позначені цифрами 1,2,3,...9.

Частота ISSR-PCR ДНК-маркерів популяції свиней української м'ясної породи харківського типу

Діапазон довжини ISSR-PCR маркерів п. н.		Свиноматки	Кнури-плідники
Довжина локусів до 1000 п. н.	250–499	0,111	0,33
	500–749	0,09	0,1
	750–999	0,08	0,09
	1000	0,111	0,166
Довжина локусів до 1000 п. н.	1	0,111	0,2
	2	0,111	0,2
	3	0,111	0,2
	4	0,111	0,2
	5	0,125	0,2
	6	0,2	0,25
	7	0,25	0,5
	8	0,5	0,5
	9	0,5	0,33

При їх електрофоретичному розподіленні спостерігали відмінності у свиней української м'ясної породи харківського типу (рис. 1).

Дослідженнями встановлено, що тварини популяції свиней української м'ясної породи харківського типу (свиноматки і кнури-плідники) різнилися між собою за кількістю ідентифікованих локусів.

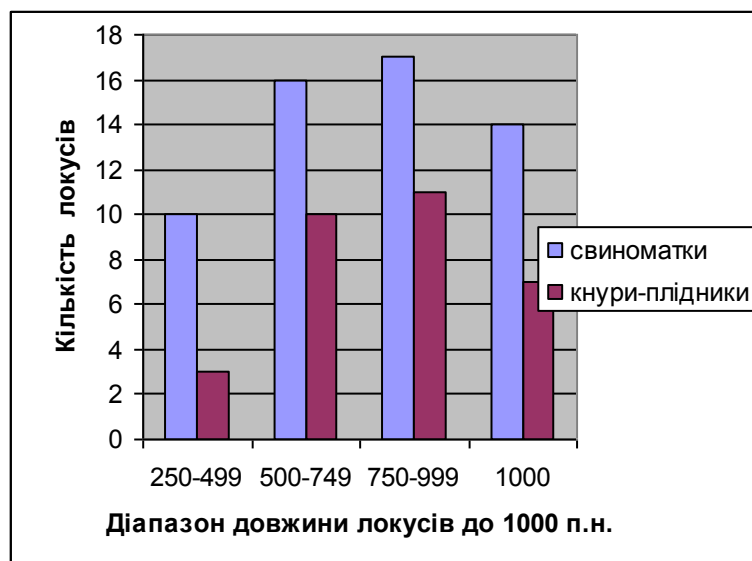


Рис. 1. Діапазон довжин ISSR-PCR маркерів до 1000 п. н. популяції свиней української м'ясної породи.

Найбільша частота легких фрагментів ДНК відмічена в діапазоні низьких молекулярних мас локусів – від 250–499 п. н. Їхня частота у свиноматок була в 3 рази більшою, ніж у кнурів-плідників ($P < 0,95$). Різниця не вірогідна.

В діапазоні від 500–749 п. н. частота ISSR-PCR ДНК-маркерів легких фрагментів молекулярної маси у свиноматок і кнурів-плідників харківського типу була на однаковому рівні.

Встановлено, що однаковий рівень молекулярних мас у свиноматок і кнурів харківського типу був у діапазоні 750–999 п. н.

В діапазоні від 999 до 1000 п. н. частота молекулярних мас у свиноматок була більшою в 1,7 раза, ніж у кнурів-плідників ($P < 0,95$). Різниця не вірогідна.

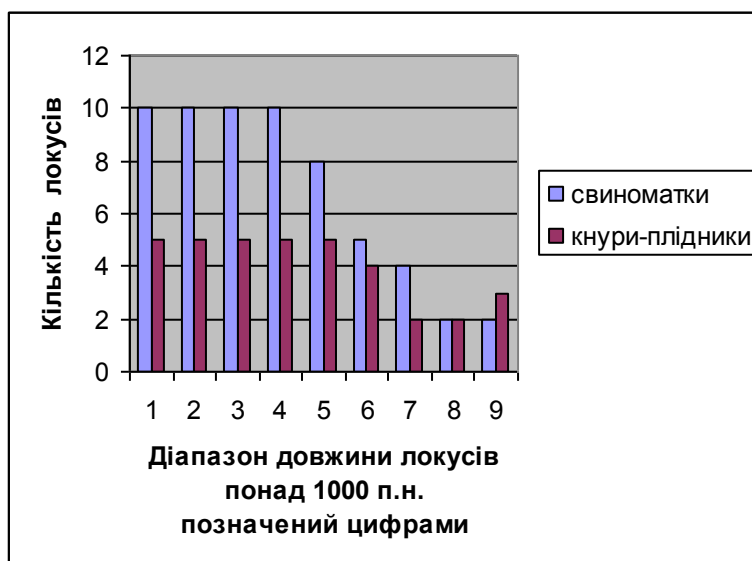


Рис. 2. Діапазон довжин ISSR-PCR маркерів понад 1000 п. н. популяції свиней української м'ясної породи.

В діапазоні довжини понад 1000 п. н. свиноматки харківського типу мали більшу частоту виявлених маркерів порівняно з кнурами ($P < 0,95$).

Висновки. Аналіз частоти виявлених молекулярно-генетичних маркерів у піддослідних тварин української м'ясної породи свиней свідчить, що свиноматки і кнури-плідники диференційовані між собою з різним ступенем вірогідності у різних діапазонах вивчених фрагментів ДНК. На наш погляд, це й зумовило відмінності між тваринами різних генеалогічних структур.

Це дає можливість використовувати генетичні маркери для формування дивергенції з необхідним рівнем диференціації структурних одиниць (ліній, родин) у середині популяції і забезпечує підтримку певного рівня мінливості в ній та підвищення продуктивності.

Бібліографічний список

1. Mullis K. B. Specific genesis of DNA in vitro via a polymerase – Catalyzed chain reaction / K. B. Mullis, F. A. Falona // Meth. Enzymol. – 1987. – Vol. 355. – P. 335–350.
2. Глазко В. И. ДНК-технологии / Глазко В. И. – К: Нора-принт. – 1997. – 150 с.
3. Балацкий В. Н. ДНК – диагностика стресс-синдрома свиней и ассоциации RYRI-генотипов с жизнеспособностью поросят раннего возраста / В. Н. Балацкий, Е. И. Метлицкая // Цитология и генетика. – 2001. – Т 35, №3. – С.43–49.
4. ДНК-технологии и биоинформатика в решении биотехнологии млекопитающих / Глазко В. И., Шульга Е. В., Дымань Т. Н., Глазко Г. В. – Белая Церковь, 2001. – 488 с.
5. Метлицкая О. І. Для ефективної селекції тварин важливо керуватися генетичною структурою / О. І. Метлицкая, К. В. Копилов // Тваринництво України. – 2010. – № 4. – С. 8–11.
6. Балацкий В. Н. Генетический полиморфизм соматотропина / В. Н. Балацкий, Е. И. Метлицкая, К. Ф. Почерняев // Молекулярно-генетические маркеры животных. – К.: Аграр. наука. – 1996. – С. 5–6.
7. Оніщенко М. М. Оптимізація техніки ISSR-PCR типування для вивчення генетичного поліморфізму генотипів різних порід свиней / М. М. Оніщенко, В. М. Балацький // Генетические аспекты онто- и филогенеза. – Днепропетровск, 2004. – С. 101–102.
8. Сметанін В. Т. Регуляція генофонду локальної популяції свиней за генетичними маркерами / В. Т. Сметанін // Наук. вісн. Львівського нац. ун-ту вет. мед. та біотехнол. ім. С. З. Гжицького. – Львів, 2007. – Т. 9, № 3 (340), ч.3. – С. 133–136.