

УДК 636.1.082:575

**Нор В.Ю.**, кандидат сільськогосподарських наук,  
молодший науковий співробітник лабораторії генетики  
Інституту свинарства і АПВ НААН

## **СПОСІБ РАННЬОЇ ОЦІНКИ ПОТЕНЦІАЛУ ФЕРТИЛЬНОСТІ КНУРІВ ЗА ДНК-МАРКЕРАМИ**

*Рецензент – кандидат біологічних наук П.В. Денисюк*

*Проведено дослідження поліморфізму генів  $ACTN1$ ,  $FSH\beta$ ,  $OPN1b$ , асоційованих з репродуктивними якостями кнурів локальних азійських порід. Молекулярно-генетичний аналіз здійснений на вибірці ремонтних кнуриців великої білої породи ПЗ «Калитянський свинокомплекс».*

*Установлені основні генетико-популяційні параметри досліджуваної мікропопуляції кнурів за локусами  $ACTN1$ ,  $FSH\beta$ ,  $OPN1b$ . Усі використані в роботі маркерні системи виявилися високополіморфними. Показано достовірний вплив гену  $\beta$ -субодиниці фолікуло-стимулюючого гормону на окремі показники спермопродукції (а саме об'єм еякуляту) у кнурів великої білої породи, сила впливу генотипу на цей показник становила 36% ( $p \leq 0,01$ ).*

*Визначено перспективи використання комплексного генотипування свиней за локусами альфа актиніну 1, остепонтину та  $\beta$ -субодиниці фолікуло-стимулюючого гормону у селекційних програмах.*

*Запропоновано систему ранньої комплексної молекулярно-генетичної оцінки кнурів для племінних господарств, елеврів та станцій штучного осіменіння з високим потенціалом репродуктивних якостей.*

*Ключові слова: ДНК-маркер, фертильність, поліморфізм, велика біла порода свиней, ПЛР-ПДРФ, гени-кандидати, локуси кількісних ознак (QTL).*

Одним з важливих економічних показників у свинарстві є репродуктивна здатність або фертильність тварин – здатність статевозрілої особини до відтворення життєздатного потомства. Здійснення штучного осіменіння у свинарстві дозволило покращити селекцію кнурів за ознакою продуктивності. У той же час, це в певній мірі нівелює саме значення індивідуальної фертильності кнура і вимагає закономірної оцінки запліднюючого потенціалу зразків сперми на станціях штучного осіменіння. Показники відтворювальної здатності кнурів характеризуються обмеженим прогресом за традиційної селекції і системі кросбридингу через низьку спадковість ознак фертильності, які доволі пізно проявляються в житті тварини, щоб слугувати корисним критерієм відбору за таким показником як ознака якості сперми.

Із розвитком молекулярно-генетичних технологій стало можливим прискорення селекції тварин. Так, контроль на рівні ДНК може бути використаний для ідентифікації окремих кандидатних генів, що відповідають за прояв економічно важливих ознак тварин. Фенотиповий вираз фертильності залежить від генотипу, який модулюється певними чинниками навколишнього середовища, тобто різноманіття фенотипових ознак обумовлено змінами в генотипі, які можна відрізнити від відхилень, спричинених дією навколишнього середовища, тільки з допомогою низки статистичних моделей. Точність та інтенсивність селекції можна поліпшити за умов використання генетичної інформації. Рішення по відбору кнура для репродукції може бути прийняте на ранньому етапі його життя, оскільки не потрібно чекати до того часу, коли стане можливим оцінити фенотип, тобто запліднюючу здатність, якість сперми та якість його потомства. Численними дослідженнями доведена можливість проведення селекції тварин за генами кількісних ознак на основі молекулярно-генетичних маркерів, що скорочує інтервал між поколіннями. Особливо великий інтерес це представляє для

характеристик фертильності свиней. Аналіз генотипу кнурця для оцінки потенціалу його репродуктивних якостей може бути проведений з використанням зразків крові чи тканин новонароджених поросят; у такому випадку немає необхідності чекати першого опоросу свиноматки, чи результатів, отриманих від нащадків цієї тварини.

У представленій роботі були використані три маркерні системи, що належать до такого класу ДНК-маркерів як SNP (Single Nucleotide Polymorphism) – це однуклеотидні позиції геномної ДНК, для яких в популяції існують різні варіанти послідовностей (алелі) з частотою рідкісного алельного варіанту не менш 1 % [1].

Для дослідження були обрані наступні QTL's (Quantitative Trait Loci's) – локуси кількісних ознак:

- локус **бета-субодиниці фолікуло-стимулюючого гормону (*FSHβ*)** – несинонімічна мутація A5894G у першому інтроні гену асоційована з показниками концентрації сперми у кнурів та багатоплідністю свиноматок [2-4];

- локус **альфа-актиніну 1 (*ACTN1*)** – однуклеотидна заміна 190G>A в інтроні впливає на кількість живих поросят при народженні та функціональні якості сперми (рухливість та концентрацію сперматозоїдів) [5-7];

- ген **остеопонтину (*OPNin6*)** – поліморфність локусу пов'язана з делецією 300 п.н. у шостому інтроні. Ця мутація впливає на процес імплантації ембріонів, показник кількості живих поросят при народженні та об'єм еякуляту [8-10].

Проаналізовані доступні літературні та інтернет-ресурси показали, що дані щодо впливу поліморфізму локусів *FSHβ*, *ACTN1*, *OPNin6* на відтворювальні якості кнурів є лише для локальних порід свиней азіяського підвиду *Sus scrofa* та різноманітних поєднань останніх з породою п'єстрен.

**Матеріали і методи.** Метою роботи був пошук асоціацій між генотипами локусів *FSHβ*, *ACTN1*, *OPNin6* та окремими показниками спермопродукції кнурів великої білої породи, як найпоширенішої породи України.

Біологічний матеріал (сперма) був відібраний від ремонтних кнурців великої білої породи ПЗ «Калитянський свинокомплекс». Дані щодо спермопродукції піддослідних тварин були взяті з індивідуальних племінних карток.

Методика виділення ДНК за допомогою реагенту "Chelex-100" була використана для виділення нуклеїнових кислот зі сперми, як експрес-метод [11]. Зразки ДНК, що були виділені даним методом, були використані для проведення ПЛР-ампліфікації.

Полімеразну ланцюгову реакцію здійснювали за методикою, оптимізованою в лабораторії генетики Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН [12] з використанням наступних пар олігонуклеотидних послідовностей (табл. 1.)

### 1. Структура праймерів, що використовували в роботі

Локус	Нуклеотидна структура праймерів (5' → 3')	Синтезований фрагмент, п.н.
<i>ACTN1</i>	FW:GCATGTGTCAACTACAAGCCCAA RV: TCATCTGCTCCTGGCTGATG	933
<i>FSHβ</i>	FW: AGTTCTGAAATGATTTTCGGG RV: TTTGCCATTGACTGTCTTAAAGG	624
<i>OPNin6</i>	FW: TCACCGATTTCCCCACCGACAC RV: TGGCTGCGGGTTTCCACACTG	1300 1000

Програми ампліфікації, за якими здійснювали ПЛР, наведені у таблиці 2.

## 2. Програми проведення ампліфікації генетичних локусів кандидатних генів продуктивності свиней

Локус	Програма ампліфікації
<i>ACTN1</i>	94 °C 5', 35 × (94 °C 30'', 63 °C 30'', 72 °C 1'), 72 °C 5'
<i>FSHβ</i>	94 °C 2', 30 × (94 °C 1', 58 °C 1', 72 °C 1'), 72 °C 5'
<i>OPNin6</i>	95 °C 2', 35 × (94 °C 45'', 65 °C 1', 72 °C 2''), 72 °C 7'

Після проведення процесу ПЛР, продукти реакції використовували для ПДРФ-аналізу (табл. 3.). Рестрикцію проводили у 15 мкл реакційної суміші кожного зразку, який складався з 10 мкл продуктів ПЛР, 1,5 мкл 10-кратного буфера та 0,15 мкл специфічної ендонуклеази. Реакційну суміш інкубували протягом 3-12 годин при температурі від 37°C до 60°C.

### 3. Методичні особливості рестриктного аналізу

Локус	Рестриктаза	Сайт рестрикції (5'→3')	Температура інкубації	Алелі та їх довжина, п.н.
<i>ACTN1</i>	<i>BstEII/Eco9II</i>	G GTNACC	60°C	A: 744+189 B: 933
<i>FSHβ</i>	<i>HaeIII/BsuRI</i>	GG CC	37°C	A: 332+208+84 B: 208+173+159+84
<i>OPNin6</i>	-	-	-	A: 1300 B: 1000

Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК локусів *ACTN1* і *OPNin6* проводили у 2% агарозному гелі, для фрагментів локусу *FSHβ* використовували 8%-ий неденатуруючий поліакриламідний гель.

Частоти алелів та генотипів локусів *FSHβ*, *OPNin6*, *ACTN1* досліджуваної мікропопуляції обчислювали за допомогою програми GenAlex 6.0 [13].

Визначення ступеня кореляції окремих генотипів локусів *FSHβ*, *OPNin6*, *ACTN1* з показниками спермопродукції тварини обчислювали за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу [14] у середовищі стандартної комп'ютерної програми Microsoft Excel 2010.

**Результати й обговорення.** Розподіл фрагментів, що відповідають різним генотипам за досліджуваними локусами, можна побачити на завершальному етапі ДНК-типуння – візуалізації електрофоретичного розділення продуктів ПЛР-ПДРФ (рис. 1-3).

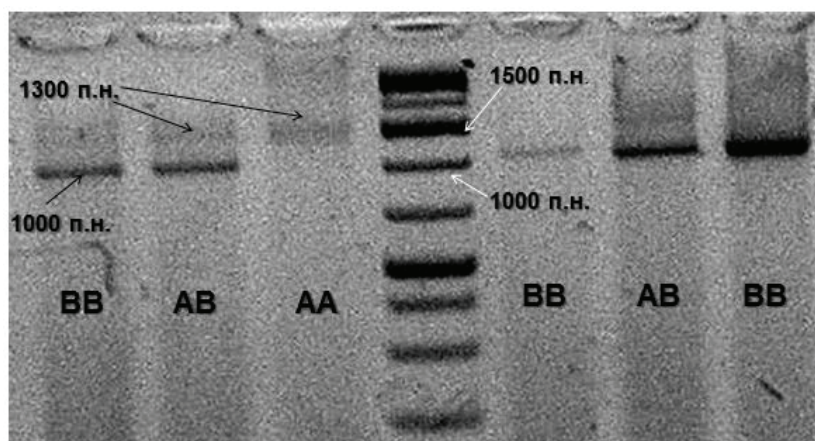


Рис. 1. Спектри ампліконів для гену остеопонтину (*OPNin6*), електрофорез у 2% агарозному гелі

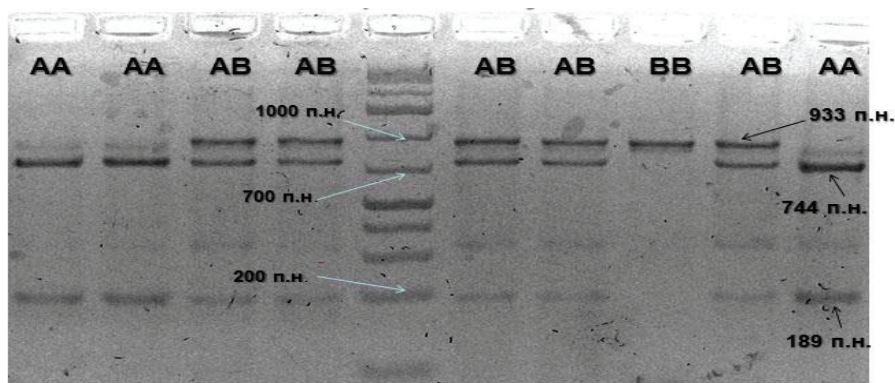


Рис 2. Спектри рестрикційних фрагментів для гену альфа актиніну 1 (*ACTN1*), електрофорез в 1,5% агарозному гелі

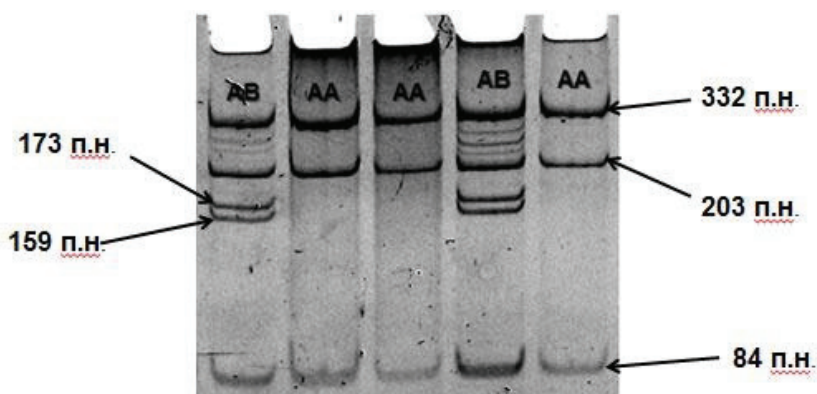


Рис 3. Спектри рестрикційних фрагментів для гену бета-субодиниці фолікулостимулюючого гормону (*FSHβ*), електрофорез у 8% поліакриламідному гелі

Генетико-популяційний аналіз стада ремонтних кнурців ПЗ «Калитянський свинокомплекс» засвідчив наявність високого рівня поліморфізму локусів *OPNin6*, *ACTN1* та *FSHβ* у дослідженій мікропопуляції тварин великої білої породи (табл. 4.).

#### 4. Генетико-популяційна характеристика ремонтних кнурців ПЗ «Калитянський свинокомплекс» за локусами фертильності

Порода	Частота					Ho	He	F <sub>is</sub>
	Генотипів (фактична/очікувана)			Алелів				
	AA	AB	BB	A	B			
Велика біла (n=24)	<i>OPNin6</i>							
	0,208 (0,141)	0,333 (0,469)	0,458 (0,391)	0,375	0,625	0,333	0,469	0,289
	<i>ACTN1</i>							
	0,292 (0,340)	0,583 (0,486)	0,125 (0,174)	0,583	0,417	0,583	0,486	-0,200
<i>FSHβ</i>								
	0,542 (0,594)	0,458 (0,353)	0,000 (0,053)	0,771	0,229	0,458	0,353	-0,297

Примітка: Ho – фактична гетерозиготність; He – очікувана гетерозиготність; F<sub>is</sub> – індекс фіксації Райта;

Аналізуючи характер розподілу частот алелів відмічаємо, що за локусом *OPNin6* більшість плідників виявилася носіями, бажаного для селекції на показники якості сперми, алелю B (0,625); протилежна тенденція спостерігається за геном *FSHβ*, де популяція насичена алелем A (0,771), що асоційований із зниженими показниками кон-



центрації сперми. Цей факт можна пояснити тим, що альтернативний алель В локусу *FSHβ* позитивно корелює з кращими відтворювальними здатностями свиноматок, а саме з показником багатоплідності. Розподіл частот алелів за геном альфа актиніну 1 носив приблизно рівномірний характер (алель А (0,583), алель В (0,417)).

Встановлене відхилення від очікуваного розподілу генотипів за локусом *OPNin6* вказує на насиченість стада інбредними особинами, і хоча цілеспрямованого відбору тварин за вказаним маркером у господарстві не ведеться, таке явище може свідчити про існування невстановлених плейотропних ефектів гена остеопонтину, що відомий як маркер відтворювальних якостей свиней. Негативні значення індексу фіксації Райта за локусами *ACTN1* та *FSHβ* свідчать про надлишок гетерозигот у популяції, а отже відсутність цілеспрямованої селекції за цими маркерами.

Виявлено високовірогідну асоціацію локусу *FSHβ* з показником «Об'єм еякуляту» у кнурів великої білої породи популяції ПЗ «Калитянський свинокомплекс», – сила впливу гена на цей показник склала 36% (табл. 5).

#### 5. Зв'язок різних генотипів за генами *OPNin6*, *ACTN1* та *FSHβ* з показниками спермопродукції кнурів великої білої породи (n=24)

Показник	<i>OPNin6</i>			D <sup>2</sup> , %
	AA X ± Sx	AB X ± Sx	BB X ± Sx	
Концентрація сперми, млн./мл	200,0±13,9	184,6±29,1	224,1±17,1	8,89
Об'єм еякуляту, мл	260,0±67,7	343,8±40,6	277,3±24,6	11,39
	<i>ACTN1</i>			
Концентрація сперми, млн./мл	215,4±20,8	206,5±21,2	187,5±5,3	2,24
Об'єм еякуляту, мл	264,3 ±49,8	325,0±31,1	287,5±42,7	6,74
	<i>FSHβ</i>			
Концентрація сперми, млн./мл	211,0±15,7	198,8±22,5	-/-	0,96
Об'єм еякуляту, мл	342,9±29,6	230±22,6**	-/-	36,19

Примітка: \*\* –  $p \leq 0,01$ , за критерієм достовірності Фішера, D<sup>2</sup> – показник сили впливу.

Найвищі показники об'єму еякуляту були відмічені у тварин гомозиготних за алелем А, що суперечить знайденим нами літературним даним [7]. За іншими локусами достовірних даних щодо асоціацій генотипів з окремими показниками відтворювальної здатності виявити не вдалося.

**Висновки.** За результатами генетико-популяційних досліджень на мікропопуляції свиней великої білої породи ПЗ «Калитянський свинокомплекс» показано, що всі використані в роботі маркерні системи є високополіморфними, що створює передумови для відбору і підбору тварин за локусами *FSHB*, *ACTN1*, *OPNIN6*. Однофакторним дисперсійним аналізом встановлено вірогідну асоціацію локусу *FSHβ* з об'ємом еякуляту кнурів великої білої породи, сила впливу генотипу на цей показник становила 36% ( $p \leq 0,01$ ). Найвищі показники об'єму еякуляту (від 200 мл до 500 мл) було відмічено у тварин, гомозиготних за алелем А. Запропонована система ранньої комплексної молекулярно-генетичної оцінки кнурів для племінних господарств, елевєрів та станцій штучного осіменіння з високим потенціалом репродуктивних якостей.

## БІБЛІОГРАФІЯ

1. Brookes A. J. The essence of SNPs / A. J. Brookes // Gene. – 1999. – Vol. 234, № 2. – P. 177.
2. Jiang Z.H. Identification and Characterization of Genetic Polymorphisms at Exon 2 of Porcine FSHB and LHB genes / Z.H. Jiang, O.J. Rottmann, F. Pirchner // (1999): (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>).
3. Chen Kefei. The combined genotypes effect of ESR and FSH $\beta$  genes on litter size traits in five different pig breeds / Kefei Chen, Ning Li // Chinese Science Bulletin. –2001. – №46(2). – P.140–143.
4. Rohrer G.A. Mapping the  $\beta$  subunit of follicle stimulating hormone (FSHB) in the porcine genome / G.A. Rohrer, L.J. Alexander, C.W. Beattie // Mammalian genome. –1994. – №5. – P. 315–317.
5. Casale A. Characterization of actin isoforms in ejaculated boar spermatozoa./ A. Casale, M. Camatini, O. Skalli, G. Gabbiani // Gamete Res. – 1988. – Vol. 20. – P. 133-144.
6. Yagi A. Localization of actin, alpha-actinin, and tropomyosin in bovine spermatozoa and epididymal epithelium / A. Yagi, J. Paranko // Anat. Rec. – 1992. – Vol. 233. – P. 61-74.
7. Cailu Lin. Candidate gene analysis for loci affecting sperm quality and fertility of boar. – Bonn, Rheinischen Friedrich-Wilhelms – Universität zu Bonn, 2005. – 216 p.
8. Van Eijk M.J. Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood / M.J. Van Eijk, I. Russ, H.A. Lewin // Mamm. Genome. – 1993. – Vol. 4. – P. 113-118.
9. Охтырская Т.А. Имплантационные потери в программах ЭКО: роль наследственной и приобретенной тромбофилии (обзор литературы) / Т.А. Охтырская, К.А.Яворовская, А.В.Шуршалина // Проблемы репродукции.– 2010. – №2 – Т.16 – С. 53-58.
10. Knoll. A. length polymorphism in an intron of the porcine osteopontin (SPP 1) gene is caused by the presence or absence of a SINE (PRE-1) element / A. Knoll., A. Stratil, S. Cepica // Animal genetics. – № 30(6). – 1999. – P. 466.
11. Walsh P.S. Chelex-100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material / P.S. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi // BioTechniques. – 1991.– №10. – P. 506.
12. Нор В. Перспективні генетичні ДНК-маркери для підвищення репродуктивності кнурів / В. Нор, О. Метлицька // Тваринництво України. Науково-практичний журнал. Київ: Паралель, 2010. – №9. – С. 18-21.
13. Peakall R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research./ R. Peakall, and P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol.6. – P. 288–295.
14. Плохинский Н.А. Руководство по биометрии для зоотехников / Н.А. Плохинский // М.: Колос, 1969. – 255 с.

**Нор В.Ю.** Способ ранней оценки потенциала фертильности хряков по ДНК-маркерам.

*Проведено исследование полиморфизма генов ACTN1, FSH $\beta$ , OPN $\beta$ , ассоциированных с репродуктивными качествами хряков локальных азиатских пород. Молекулярно-генетический анализ осуществлен на выборке ремонтных хряков крупной белой породы ПЗ «Калитянский свинокомплекс».*

*Установлены основные генетико-популяционные параметры исследуемой микропопуляции хряков по локусам ACTN1, FSH $\beta$ , OPN $\beta$ . Все использованные в работе маркерные системы оказались высокополиморфными. Показано достоверное влияние гена  $\beta$ -субъединицы фолликуло-стимулирующего гормона на отдельные показатели спермопродукции (а именно объем эякулята) у хряков крупной белой породы, сила влияния генотипа на этот показатель составил 36% ( $p \leq 0,01$ ).*

*Определены перспективы использования комплексного генотипирования свиной по локусам альфа актинина 1, остепонтина и  $\beta$ -субъединицы фолликулостимулирующего гормона в селекционных программах.*

*Предложена система ранней комплексной молекулярно-генетической оценки хряков для племенных хозяйств, элеваторов и станций искусственного осеменения с высоким потенциалом репродуктивных качеств.*

*Ключевые слова: ДНК-маркер, фертильность, полиморфизм, крупная белая порода свиней, ПЦР-ПДРФ, гены-кандидаты, локусы количественных признаков (QTL).*

**V.Y. Nor.** The method for early evaluation on potential fertility boars DNA markers. A study of polymorphisms of genes *ACTN1*, *FSH $\beta$* , *OPNin6*, associated with reproductive qualities boars local Asian species. Molecular genetic analysis carried out on a sample repair boars large white breed HP "Kalytyanskyu pig farm."

*The established major genetic and population parameters studied micropopulation boars for loci *ACTN1*, *FSH $\beta$* , *OPNin6*. All marker used in the system were high polymorphic. Showing credible influence gene  $\beta$ -subunit of follicle stimulating hormone for individual sperm parameters (namely the volume of ejaculate) in boars of large white breed, genotype impact strength at this figure was 36% ( $p \leq 0,01$ ).*

*The prospects of complex use of genotyping pigs for loci alpha-actinin 1, osteopontin and  $\beta$ -subunit of follicle stimulating hormone in breeding programs.*

*A comprehensive system of early molecular genetic evaluation boars for breeding farms and elevators stations of artificial insemination with high potential reproductive qualities.*

УДК 636.082:575

**Корінний С.М.**

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН

### **ВПЛИВ СИСТЕМИ РОЗВЕДЕННЯ НА ПОПУЛЯЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНІ ПАРАМЕТРИ СТАДА**

*Рецензент – кандидат біологічних наук В.М. Балацький*

*У статті наведено дані про вплив системи розведення на популяційно-генетичні параметри стада за мікросателітним локусом FH4219. В господарстві «замкненого» типу (ТОВ «Україна-Т») виявлено більшу аельну різноманітність в порівнянні з господарством «відкритого» типу ТОВ «Фрідом Фарм бекон» про, що свідчить різна кількість виявлених алелів 5 і 3 відповідно. Було виявлено приватні алелі, частоти яких достовірно відрізнялись між досліджуваними популяціями. За частотами алелів 84 н. ( $p < 0,05$ ) і 96 н. ( $p < 0,01$ ) тварини господарства ТОВ «Україна-Т» відрізнялись від тварин ТОВ «Фрідом Фарм бекон» у яких даних алелів не виявлено. В свою чергу у тварин ТОВ «Фрідом Фарм бекон» виявлено алель 88 н. який в господарстві ТОВ «Україна-Т» був відсутнім ( $p < 0,001$ ).*

*Ключові слова : мікросателітний локус, частоти алелів, рівні гетерозиготності, генетична дистанція, генетична різноманітність.*

**Вступ.** На сьогоднішній день в свинарських господарствах використовують дві системи розведення «відкрити» – коли тварини постійно завозяться з інших госпо-