УДК 575.116:575.2
© 2011

***Метлицька О.І., кандидат сільськогосподарських наук,***
***Гиря В.М., кандидат сільськогосподарських наук***
Інститут свинарства ім. О.В. Квасницького НААНУ

# ГЕНЕТИКО-СЕЛЕКЦІЙНІ АСПЕКТИ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЛЕМІННОЇ ЦІННОСТІ КНУРІВ

***Рецензент – кандидат сільськогосподарських наук, професор В.М. Нагаєвич***

*Показана перспективність прогнозування племінної цінності кнурів на основі фенотипової індексної оцінки з урахуванням параметрів генетичної поєднуваності батьківських пар та гомозиготності особин за даними полілокусного ISSR-типування. Встановлено, що визначення плідників-поліпшувачів за допомогою селекційних індексів та модальних класів розподілу не завжди є ефективними методами. Залучення додаткової інформації на генетичному рівні – більш перспективніший спосіб використання найкращих генотипів у селекційному процесі.*

***Ключові слова:*** *мікросателіти, ДНК, фінгерпринт, локус, гомозиготність, генетичний потенціал, селекційний індекс.*

**Постановка проблеми.** У селекції сільськогосподарських тварин вирішальне значення мають поглиблені дослідження закономірностей механізму передачі генетичної інформації в поколіннях та її реалізації на індивідуальному й популяційному рівнях організації біологічних систем [5].

Починаючи з середини 80-х років XX століття, в практичній селекції відбувся перехід від використання показників продуктивності (фенотип) до застосування оцінки тварин на основі молекулярно-генетичних маркерів, а вже з 90-х років – до впровадження комплексної оцінки потенціалу племінних тварин у селекційному процесі (маркер-асоційована та геномна селекції) [13, 15].

Проте в Україні, у зв'язку із спадом виробництва свинини, низькою рентабельністю галузі, недостатністю функціонуючих станцій контрольної відгодівлі та неможливістю забезпечення відповідного рівня годівлі тварин у більшості господарств виникає суттєва проблема адекватної оцінки племінного потенціалу кнурів-виробників та прогнозування оптимальної поєднуваності батьківських пар для отримання високопродуктивного молодняку. Отже, без практичного використання сучасних біотехнологічних та генетико-популяційних методів подальший розвиток галузі свинарства, конкурентоспроможної в умовах сучасного ринку, є майже неможливим.

**Аналіз основних досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання проблеми.** У даний час, забезпечення продовольчого ринку якісними продуктами вітчизняного виробництва в достатньому обсязі неможливе без інтенсифікації тваринництва, однією зі складових якої є ефективна селекція, що повинна базуватись на використанні новітніх біотехнологій, а саме методах оцінки потенційно цінних у племінному відношенні тварин на рівні генотипу із застосуванням молекулярно-генетичних маркерів [8]. Вони дають змогу не тільки проводити дослідження генетичної структури порід, оцінювати характер проходження мікроеволюційних процесів у популяціях сільськогосподарських тварин під впливом штучного відбору, але й проводити прогнозування їх продуктивних якостей. Ідентифікація і контроль генетичної мінливості − обов'язкова умова збереження і вдалого використання існуючих порід тварин [7]. Для вирішення цих актуальних питань тваринництва тривалий час традиційно використовувались імуногенетичні маркери. Проте занижений рівень генетичного поліморфізму, що виявляється за допомогою цих систем, переважно діалельний стан локусів, відсутність прямого зв'язку з продуктивними ознаками тварин та висока собівартість виробництва імунологічних сироваток призвели до необхідності пошуку більш інформативних маркерів, що ґрунтуються на визначенні варіабельності різноманітних послідовностей ДНК.

З-поміж значної кількості ДНК-маркерів, на нашу думку, особливої уваги заслуговує технологія полілокусного сканування геному тварин із застосуванням міжмікросателітного аналізу в техніці ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція). Так званий ISSR метод (від англійського Inter Simple Sequence Repeat – інвертовані прості послідовності, що повторюються); молекулярно-генетична технологія, яка базується на ампліфікації ДНК-фрагментів, розташованих між інвертованими послідовностями мікросателітного повтору, що використовується в якості праймера. Він був створений Євою Зіткевич у 1994 році

[16] переважно для дослідження недостатньо вивчених біологічних об'єктів за відсутності генетичних карт, набувши неабиякого значення для вирішення окремих проблем популяційної генетики рослин. У тваринництві проводилися поодинокі дослідження щодо можливостей використання даної технології для диференціації деяких видів полорогих [2], оцінки генетичної структури порід великої рогатої худоби та внутрішньопородних груп [3].

Власно проведені дослідження дали можливість створити десять ISSR-систем типування свиней, що дозволяють оцінити не тільки індивідуальний, внутрі- та міжпородний генетичний поліморфізм, але й провести генетичну паспортизацію порід і генеалогічних ліній [10], оцінити ступінь їх консолідації, спрогнозувати оптимальні параметри поєднуваності батьківських пар із метою отримання гетерозисного молодняка на внутріпородній [1] та міжпородній основі [14].

**Мета досліджень та методика їх проведення.** Метою даної роботи була спроба генетичного прогнозування племінної цінності кнурів і порівняння отриманих результатів із даними індексної оцінки за параметрами їх власної продуктивності та генеалогії.

Відбір біоматеріалу (кров із вушної вени) проводили від свиней великої білої породи ДП «Експериментальна база «Надія» ІС ім. О.В. Квасницького НААНУ у кількості 38 голів (за схемою: кнур; дві закріплені матки; 8 нащадків із гнізда). В цілому у досліді використано 4 сім'ї двох кнурів різних модальних класів. При цьому до класу М ± відносили тварин, які знаходилися в межах М ± 0,67σ, відповідно до класів $M^+$ і $M^-$ належали кнури з високим і низьким середнім показником результату оцінки їх індивідуального росту та розвитку (середньодобовий приріст, г; товщина шпику на рівні 6–7-го грудних хребців, мм; витрати корму на 1 кг приросту, корм. од.; довжина тулуба, см). Селекційний індекс, сконструйований для даної популяції кнурів за методикою В.І. Степанова і М.В. Михайлова [11], – $I = 0,16 (X_1 – 367,5) + 2,15 (6,45 – X_2) + 0,62 (19,8 – X_3) + 0,25 (X_4 – 122)$, де $X_1$ – середньодобовий приріст (г), $X_2$ – витрати кормів на 1 кг приросту (корм. од), $X_3$ – товщина шпику на рівні 6–7-го грудних хребців (мм), $X_4$ – довжина тулуба (см).

Відібрано по два плідники з різних модальних класів розподілу та проведено осіменіння ними рандомізовано відібраних свиноматок-першоопоросок. За результатами оцінки репродуктивного фітнесу було відібрано два плідники категорій поліпшувач (М+) і нейтральний (М0).

Умови годівлі та утримання були ідентичними для всіх груп тварин, відповідно до зоотехнічних норм з урахуванням віку, живої маси та фізіологічного стану [6]. Тип годівлі – концентрат ний, із використанням кормів власного виробництва.

Виділення ДНК здійснювали з цитратної венозної крові шляхом застосування реагенту «Chelex-100». ДНК-генотипування свиней проводили шляхом ампліфікації ДНК у полімеразній ланцюговій реакції з використанням ISSR – праймерів, структура та характеристика яких наведена в таблиці1. Режим ампліфікації фрагментів ДНК, методики їх електрофоретичного розділення, візуалізації та детекції детально описані в попередніх роботах [9, 10].

Для оцінки руху генетичного матеріалу від батьків нащадкам використовували розрахунок коефіцієнту материнських і батьківських алелей за формулами:

Еб = (пм/пб + пм) х 100, Ем = (пб/пм + пб) х 100,

де: Еб – коефіцієнт елімінації алелей батька, виражений у відсотках;

Ем – коефіцієнт елімінації алелей матері, виражений у відсотках;

пм – кількість успадкованих материнських алелей потомками;

пб – кількість батьківських алелей.

Коефіцієнт попарної схожості фінгенрпринтних маркерів розраховували за формулою: Sf = 2Fab : (Fa + Fb),

де Sf – коефіцієнт попарної схожості;

Fab – кількість смуг, що співпадають у порівнюваних парах;

Fa, Fb – загальна кількість смуг, що виявляється для кожної особини.

Біометричну обробку одержаних даних проведено методом варіаційної статистики за М.О. Плохинським [12] та застосуванням пакету

***1. Характеристика інформативності праймерів, використаних у сімейному аналізі великої білої породи свиней.***

| Структура праймерів | Кількість ДНК-смуг | Діапазон молекулярної маси ДНК-смуг | Температура випалювання праймера | Маркерний індекс |
|---|---|---|---|---|
| $S1(AGC)_6C$ | 27 | 450–1600 | 57 $^0$C | 3,958 |
| $S2(AGC)_6G$ | 27 | 500–1500 | 57 $^0$C | 4,244 |
| $S6(TCG)_6C$ | 34 | 250–1600 | 57 $^0$C | 4,300 |

стандартних комп'ютерних програм GELSTAT та Stastistica 5.0.

**Результати досліджень.** За результатами індексної оцінки, проведеної на основі результатів власної продуктивності та генеалогічних даних, кнури № 12323 та № 12603 великої білої породи були визнаними, відповідно, як перспективні поліпшувач та нейтральний.

Після проведеного закріплення за цими кнурами двох пар свиноматок встановлено, що репродуктивні якості останніх за основними показниками власної продуктивності (багатоплідність, збереженість молодняку до відлучення) вірогідно не відрізнялися з певною тенденцією до підвищення цих параметрів у свиноматок, закріплених за кнуром Йола 12603 (№№ 5486 (одна сім'я), 5484 (друга сім'я)). Проте відмічена статистично достовірна відмінність за великоплідністю, оскільки матки, закріплені за кнуром Гюльтор 12323, переважали за цим параметром маток №5496, 5792 (третя – четверта сім'я; кнур №12323) на 21,7 % ($P<0,1$). Оцінка відгодівельних якостей молодняку на контрольному вирощуванні показала, що нащадки кнура №12603 перебільшували поросят третьої – четвертої сім'ї на 10,04 % за середньодобовим приростом ($P<0,05$) і конверсією корму на 18,67 % ($P<0,01$). Таким чином, за результатами контрольного вирощування спостерігали помилковий результат індексного прогнозу – кнур №12603 виявився поліпшувачем, а тварина за №12323 може вважатися погіршувачем відгодівельних якостей молодняку. Метою роботи було встановлення причини цього явища при оцінці дотримання принципу аналогів при доборі пар мати–батько на генетичному рівні.

Отже, за всіма досліджуваними системами маркерів (табл. 2) спостерігається переважне перебільшення коефіцієнтів елімінації батьківських алелей. Згідно з проведеними дослідженнями, системи S2, S6, сприяють синтез ДНК-фрагментів, розташованих на Х хромосомі. Окрім цього не виключена ампліфікація окремих повторюваних ділянок мітохондріальної ДНК, що відноситься до позаядерного типу спадкування, а її наявність притаманна лише особинам жіночої статі. Одним із гіпотетичних варіантів пояснень переважного спадкування певних материнських алелей може бути явище презиготичного відбору або ембріональна загибель особин певних генотипів, що у ссавців, а саме свиней, вивчено недостатньо.

Таким чином, використаний підхід може бути надійним критерієм маркерування гоносом, проте не може однозначно встановити причину нерівномірної передачі спадкового матеріалу від батьків до нащадків. За системою S1, у середньому, коефіцієнт елімінації батьківських алелей для кнура №12323 склав 58,0 % проти 51,3 % – для кнура №12603. Тобто, кнур №12323 є носієм небажаних алелей, що відсікаються природнім добором на ранніх етапах ембріонального та постнатального розвитку його поросят. Для кнура №12603 сумарно за цією системою характерною є збалансована передача алелей за класичними законами генетики 50:50 у парах мати–батько. В цілому для кнура №12603 був проведений більш гомогенний у генетичному відношенні підбір маток – 0, 471 та 0,515 проти варіантів добору для кнура №12323, де коефіцієнти попарної схожості в парах мати–батько склали 0,359 та 0,277 відповідно. Проте середня очікувана гетерозиготність нащадків двох кнурів сумарно за трьома ISSR-системами майже не відрізнялися статистично і знаходилися на рівні 0,3950 (для кнура №12603) та 0,4464 (для нащадків кнура №12323). Оптимальним варіантом поєднань батьківських пар для підвищення репродуктивних якостей свиноматок є добір за коефіцієнтами схожості батьків на рівні 0,5–0,6. У даному випадку також оптимальний із генетичної точки зору підбір був здійснений для кнура №12603. Таким чином, кнура №12323, віднесеного за індексною оцінкою до категорії «поліпшувач», можна оцінити як погіршувача відгодівельних якостей, а «нейтральність» кнура 12603 підтверджується і методами генетичного аналізу.

***2. Популяційно-генетична оцінка рівня алельної елімінації та схожості батьківських пар у сімейному аналізі***

| ISSR маркер | Коефіцієнти елімінації алелей, % | | | | | | | | Коефіцієнти попарної схожості, Sf | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ♀5486 х ♂12603 | | ♀5684 х ♂12603 | | ♀5496 х ♂12323 | | ♀5792 х ♂12323 | | ♀5486 х ♂12603 | ♀5684 х ♂12603 | ♀5496 х ♂12323 | ♀5792 х ♂12323 |
| | $E_б$ | $E_м$ | $E_б$ | $E_м$ | $E_б$ | $E_м$ | $E_б$ | $E_м$ | | | | |
| S1 | 38,4 | 61,6 | 64,1 | 35,9 | 68,2 | 31,8 | 47,8 | 52,3 | 0,718 | 0,519 | 0,353 | 0,121 |
| S2 | 65,1 | 34,9 | 54,8 | 45,2 | 53,8 | 46,2 | 34,6 | 65,4 | 0,500 | 0,563 | 0,417 | 0,334 |
| S6 | 46,9 | 53,1 | 64,5 | 35,6 | 56,8 | 43,2 | 56,7 | 43,4 | 0,194 | 0,462 | 0,308 | 0,375 |
| Разом | 50,1 | 49,9 | 61,1 | 38,9 | 59,6 | 40,4 | 46,4 | 53,6 | 0,471 | 0,515 | 0,359 | 0,277 |

***3. Селекційно-генетичний потенціал продуктивної здатності кнурів-плідників***

| Плідник | Селекційні індекси | | | Сумарний індекс, ∑I | Іпп |
|---|---|---|---|---|---|
| | репродуктивного фітнесу | відгодівельних якостей | спермопродуктивності | | |
| Гюльтор 12323 | +27,2 | -7,7 | -11,4 | +8,1 | +10,8 |
| Йола 12603 | -26,6 | +23,4 | +10,5 | +19,7 | +15,8 |

Згідно з даними проведеного досліду і даних контрольного вирощування нащадків двох кнурів-плідників встановлено, що для кнура №12603 був здійснений більш оптимальний, із генетичної точки зору, добір маток внаслідок чого його нащадки (порівняно з ровесниками від плідника №12323) проявили кращі показники продуктивності. Очевидно, що племінна цінність тварин полягає в їх генотипі, який повинен бути таутизиготним, тобто здатним давати собі подібних без розщеплення в наступних генераціях [16].

Таким чином, здійснення оцінки племінного потенціалу кнурів лише за індексними критеріями без урахування специфіки їх генотипу та особливостей добору в парах мати–батько може призвести до некоректних висновків при переведенні ремонтного молодняку до основної групи стада. Тому, для виявлення селекційно-генетичного потенціалу кнурів-плідників нами був розроблений індекс:

$$I_{ПП} = \sum I \cdot \frac{Гn}{Sf},$$ де

Іпп – індекс племінного потенціалу;

∑I – сумарний індекс, в якому об'єднано селекційні індекси репродуктивного фітнесу, відгодівельних якостей і спермопродуктивності;

Гn – коефіцієнт гомозиготності потомства;

Sf – коефіцієнт попарної схожості мати-батько.

Проведений індексний аналіз (табл. 3) продуктивності плідників показав, що Гюльтор 12323 є поліпшувачем репродуктивної здатності й виступає погіршувачем за відгодівельними якостями та спермопродуктивністю. В свою чергу, Йола 12603 погіршував лише репродуктивний фітнес. Тому саме Йола 12603 характеризувався вищим селекційно-генетичним потенціалом.

Даний метод оцінки тварин підтверджує, що виявлення плідників-поліпшувачів за допомогою селекційних індексів та модальних класів розподілу не завжди буває ефективним, а залучення додаткової інформації на генетичному рівні, насамперед їх гомозиготності та попарної схожості мати–батько, більш перспективний спосіб використання найкращих генотипів у селекційному процесі.

**Висновок.** Експерименти, проведені на тваринах великої білої породи, підтвердили, що оптимальним рівнем добору батьківських пар для підвищення відгодівельних якостей отриманого молодняку на вирощуванні є індекси схожості на рівні 0,5–0,6. Слід відзначити, що гетерогенні варіанти добору забезпечують лише збільшення великоплідності, (в нашому експерименті – на великій білій породі) перевага за цим показником у парах гетерогенного добору (0,277–0,359) становить 21,7 % ($p<0,1$) при зниженні відгодівельних якостей отриманих нащадків. Розроблений на основі феногенетичних параметрів індекс племінного потенціалу сприятиме відбору кращих кнурів-плідників, прогнозувати продуктивність потомства та проводити селекційно-племінну роботу в напрямі консолідації стада за бажаними ознаками.

**БІБЛІОГРАФІЯ**

1. *Войтенко С.Л., Метлицька О.І., Вишневський Л.В. [та ін.]*. Застосування методу ISSR-типування для оптимізації селекційного процесу у малочисельних породах свиней як засобу індивідуального підбору для підвищення продуктивності та збереження генетичної різноманітності тварин зникаючих популяцій / Деклараційний патент України №34698 з пріорітетом від 26.08.2008, бюлетень №16.

2. *Глазко В.И.* ДНК-технологии и биоинформатика в решении проблем биотехнологий млекопитающих / В.И. Глазко, Е.В. Шульга, Т.Н. Дымань [и др.] / Б. Церковь. – 2001. – 487 с.

3. *Городная А.В.* ISSR-PCR в дифференциации генофондов пород крупного рогатого скота / А.В. Городная, В.И. Глазко // Цитология и генетика. – 2003. – Т. 37. – №1. – С. 61–67.

4. *Дубинин Н.П.* Общая генетика. – М. : Наука, 1986. – 559 с.

5. *Епишко Т.И., Курак О.П.* Генетические основы в решении задач современного свиноводства // Современные проблемы интенсификации произ-

водства свинины: сб. науч. трудов XIV науч. конф. 11–13 июля 2007 г.: тезисы докл. – Ульяновск, 2007. – Т. 1. – С. 33–40.
6. *Калашников А.П.* Нормы и рационы кормления сельскохозяйственных животных / А.П. Калашников, В.И. Клейменов, В.И. Бакланов [и др.] / Под ред. А.П. Калашникова. – М. : Агропромиздат, 1985. – 351 с.
7. *Кириченко В.А.* Особливості поліморфізму білків і факторів груп крові та його використання в селекції овець асканійського типу багатоплідного каракулю / В.А. Кириченко / Автореф. дис... канд. с.-г. наук: 06.02.01. – Херсон, 2006. – 19 с.
8. *Копилов К.В.* ДНК-діагностика у селекційно-племінній роботі / К.В. Копилов / Методологія наукових досліджень з питань селекції, генетики та біотехнології у тваринництві. Матеріали науково-теоретичної конференції, присвяченої пам'яті академіка УААН Валерія Петровича Бурката. – К. : Аграрна наука, 2010. – С. 68–69.
9. *Метлицька О.І.* Методичні і прикладні особливості використання ISSR-PCR маркірування внутрішньо- та міжпородної мінливості свиней // Міжвідомчий тематичний науков. збірник «Розведення і генетика тварин». – К., 2008. – Вип. 42. – С. 187–197.
10. *Метлицька О.І., Перетятько Л.Г., Копилов К.В.* Перспектива полілокусного ДНК-типування для генетичного контролю створення генеалогічних ліній у свинарстві // Зб. наук. праць. – Серія «Технологія виробництва і переробки продуктів тваринництва» – Вип. 18. – 2010. – С. 126–128.
11. *Михайлов К.В.* Методика составления селекционных индексов при оценке свиней по собственной продуктивности / Н.В. Михайлов, А.П. Родионов, В.Д. Мильченко // Труды Дон. зон. НИИСХа, 1976. – Т. 8. – С. 128–133.
12. *Плохинский И.А.* Руководство по биометрии для зоотехников / И.А. Плохинский. – М. : Колос, 1969. – 256 с.
13. *Смарагдов М.Г.* Тотальная геномная селекция с помощью SNP как возможный ускоритель традиционной селекции / М.Г.Смарагдов // Генетика. – 2009. – Т. 45. – С. 725–728.
14. *Getya A.A., Metizkaya O I., Willeke H.* Prediction of compatibility of different breeds of pigs in hyridization schemes by means of polylocus ISSR-PCR typing // Abstracts of the 59th annual meeting of the European Association for animal prodaction. – Vilnius, Lithuania. – 2008. – P. 116.
15. *Meuwissen T.H.E., Hayes B.J.* Genomic selection // J. Animal. Breed. Genet. – 2007. – V. 8. – P. 323–330.
16. *Zietkiewicze E., Rafalski A., Labuda D.* Genome finger-printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. – V. 20. – 1994. – P. 176–183.