

микроинъекций рекомбинантных ДНК с целью создания трансгенных животных / И.Л. Гольдман, Е.Л. Садчикова, С.Г. Кадулин, Н.В. Гнучев // Доклады академии наук. – М., 2002. – Т. 384. – № 5. – С. 699-703.

УДК 636.4.082.2

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ПОПУЛЯЦИЙ ХРЯКОВ-ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ ПО ЛОКУСУ ГЕНА RYR1

И.П. ШЕЙКО, доктор сельскохозяйственных наук
Т.И. ЕПИШКО, кандидат сельскохозяйственных наук
Н.В. ПОДСКРЕБКИН, кандидат сельскохозяйственных наук
О.П. КУРАК, кандидат сельскохозяйственных наук
И. Ф. ГРИДЮШКО, кандидат сельскохозяйственных наук
Н.В. ЖУРИНА, М.А. КОВАЛЬЧУК
РУП «Институт животноводства НАН Беларуси»

Резюме. Проведен анализ генетической структуры хряков-производителей различных популяций свиней, разводимых в республике, по локусу RYR1 гена. Частота встречаемости аллельных вариантов гена RYR1 существенно различается не только на межпородном, но и на внутрипородном уровне.

Ключевые слова: свиньи, злокачественная гипертермия, ген RYR1, полиморфизм.

Введение. Селекция свиней на увеличение мясности и одновременное уменьшение содержания жира сопровождается заметным ухудшением качества мяса. Возникает парадокс: там, где интенсивно ведется селекция пород свиней на увеличение мышечной массы, одновременно увеличивается и число животных, характеризующихся повышенной чувствительностью к стрессам [2, 7]. В результате, при давлении окружающей среды на организм животного, превышающем адаптационные возможности, возникает заболевание, сопровождающееся злокачественной гипертермией вследствие мутации в рианодинрецепторном гене RYR1 и снижением естественной резистентности, что приводит к увеличению отхода поросят, резкому снижению откормочной и мясной продуктивности, ухудшению качества мяса.

Влияние RYR1 – генотипа на признаки туши составляет от 3,5 до 27%, на критерии качества мяса – до 60%, на прирост живой массы – до 10 %, а породы– 20-72 % [9]. Поэтому в зарубежном свиноводстве широко используется анализ на наличие нежелательной мутации в гене RYR1, ответственной за предрасположенность животных мясных пород к злокачественной гипертермии.

Согласно полученным нами данным [3, 4], молодняк белорусской мясной породы, свободный от мутации в гене RYR1 с гомозиготным

генотипом (NN), характеризовался более высокой скоростью (179,1 дня) и энергией роста (732,4 г; $P < 0,01$), более низкими затратами корма на 1 кг прироста (3,64 корм. ед.; $P < 0,05$), а также более длинной тушей (98,9 см; $P < 0,01$) и тонким шпиком (25,2 мм), что значительно превышало аналогичные показатели животных-носителей точковой мутации с гетерозиготным генотипом (Nn) (соответственно на 3,5 дня, или 1,9 %; 33,1 г – 4,7 %; 0,14 корм. ед. – 3,7 %; 1,3 см – 1,3 %; 2,4 мм – 8,7 %)

У большинства пород России частота встречаемости рецессивного аллеля *n* составила менее 7 %. Однако у мясных пород ландрас, пьетрен, советская мясная, его частота достигла 15 % и более [1]. Аллель *n* наиболее часто встречается у свиней породы пьетрен, отличающейся наиболее высоким содержанием мяса в туше: у французского пьетрена частота встречаемости составляет 80 %, у немецкого – 94-100 % [12], однако по другим данным [10], частота встречаемости мутантного аллеля у французского пьетрена достигает 31-100 %. У различных пород ландраса частота аллеля *n* колеблется от 3 до 85 %.

Существуют противоречивые мнения по поводу направления использования хряков с генотипами Nn и nn гена RYR1. Некоторые [9] рекомендуют проводить элиминацию Nn и nn генотипов из племенных стад, другие считают, что нет ассоциации генотипов Nn и nn с продуктивными качествами популяции свиней породы ландрас [12]. Но лучшая стратегия для селекционных организаций – удостовериться, что все поголовье убойных свиней свободно от *n* гена [11], хотя носителей мутантного аллеля *n* можно использовать для производства товарной продукции, а в случае наличия гетерозигот в племенном стаде при подборе родительских пар следует исключить возможность получения рецессивных гомозигот [5].

Настоящее исследование проведено с целью анализа распространения аллельных вариантов RYR1 гена в различных популяциях пород свиней Беларуси, а также разработки эффективных приемов по выявлению носителей мутантного аллеля *n*.

Материалы и методика исследований. Проведено ДНК-тестирование хряков-производителей пород: крупной белой (КБ), белорусской мясной (БМ), белорусской черно-пестрой (БЧ), ландрас (Л), пьетрен (П), разводимых в РУСП «Заречье» Минской, РУСП СГЦ «Заднепровский» Витебской областей, УКСП «Боровица» Брестской и СГЦ «Заречье» Гомельской областей.

Ядерную ДНК выделяли из ткани уха свиней фенол-перхлоратным методом с собственными модификациями.

Аmplификацию фрагмента рианодин-рецепторного гена проводили методом ПЦР [5], для чего использовали два праймера:

RYR 56.1: 5' – GTGCTGGATGTCCTGTGTTCCT-3';
 RYR 56.2: 5' – CTGCGACATAGTTGATGAGGTTTG - 3'.

Продукты ПЦР длиной 134 п. н., проверенные на концентрацию и специфичность, расщепляли рестриктазой HinfI, разделяли электрофорезом с напряжением 100 В в 2%-ном агарозном геле в течение 1,5 часов. Наличие мутантного аллеля выявляли по элиминации сайта рестрикции эндонуклеазы HinfI.

Результаты эксперимента и их обсуждение. При исследовании ядерной ДНК свиней выявлен полиморфизм гена RYR1, представленный двумя аллелями: N – без мутации, n – с точковой мутацией. Определены генотипы: NN – свободные от мутации (устойчивые к стрессу) и Nn – носители злокачественной гипертермии и nn – с точковой мутацией (чувствительные к стрессу) (табл. 1).

Таблица 1.

Генетическая структура популяций хряков-производителей по локусу RYR гена.

№ п/п	Хозяйство, регион	Порода	Кол-во голов	Частота встречаемости генотипов, %			Частота аллелей	
				NN	Nn	nn	N	n
1	РУСП «Заречье» Минская обл.	БМ	13	76,9	23,1	-	0,880	0,120
2	РУСП СГЦ «Заднепровский» Витебская обл.	БМ	32	75	25	-	0,875	0,125
3	-//-	КБ	37	86,5	13,5	-	0,930	0,070
4	УКСП «Боровица» Брестская обл.	БМ	18	77,8	22,2	-	0,889	0,111
5	-//-	КБ	11	72,7	27,3	-	0,860	0,140
6	-//-	БЧ	20	85	15	-	0,930	0,070
7	-//-	Л	22	77,3	13,6	9,1	0,840	0,160
8	СГЦ «Заречье» Гомельская обл.	БМ	4	100	-	-	1,00	-
9	-//-	БЧ	6	66,7	33,3	-	0,830	0,170
10	-//-	КБ	19	94,7	5,3	-	0,970	0,030
11	-//-	Л	10	100	-	-	1,00	-
12	-//-	П	1	100	-	-	1,00	-

Выявлено, что частота встречаемости аллельных вариантов гена RYR1 существенно различается не только на межпородном, но и на внутрипородном уровне, и в ряде случаев превышает межпородные различия.

Анализ ДНК по локусу гена RYR1 у 194 хряков-производителей различных пород из четырех хозяйств позволил выявить значительные отличия частоты встречаемости мутантного аллеля гена RYR1 в различных популяциях одной породы. Так, у белорусской мясной породы частота встречаемости гетерозиготных генотипов (Nn) колеблется от 0

до 25 %, а частота аллеля n – от 0 до 0,125. У крупной белой породы носителями злокачественной гипертермии являются от 5 до 27,3 % животных с частотой аллеля n от 0,030 до 0,140.

Необходимо отметить, что согласно результатам ДНК-тестирования [6], встречаемость гетерозиготных генотипов в популяции крупной белой породы Беларуси составила 1,7 %, что значительно отличается от полученных нами данных.

Высокой концентрацией мутантного аллеля n (0,170) характеризуется популяция хряков-производителей белорусской черно-пестрой породы в РУСП СГЦ «Заречье» Гомельской области (33,3 %).

Выявлено, что частота мутантного аллеля гена RYR1 у производителей одной породы, и, как следствие, у их потомков, принадлежащих к различным хозяйствам, превышает межпородные различия, причем ситуация может быстро меняться при закупке и интенсивном использовании хряков-производителей – носителей мутантного аллеля. Полученные данные свидетельствуют о сложности прогнозирования уровня встречаемости дефектного гена в популяциях свиней и необходимости регулярного тестирования племенных и ремонтных хряков, а также импортируемого поголовья племенных животных.

Нередко животные с Nn генотипом являются уникальными, характеризуются высокими показателями мясной продуктивности, поэтому необходимо индивидуально подходить к определению направления их использования, а именно, при подборе родительских пар исключить возможность получения рецессивных (nn) гомозигот. Бесконтрольное использование такого материала в племенных целях представляется нам небезопасным.

Выводы. Исследования по ДНК-маркированию гена RYR1 у свиней в Беларуси находятся в стадии накопления фактов. Имеющиеся в научной литературе сообщения по поводу направления и использования аллельных вариантов носят противоречивый характер, а результаты исследований, полученные на весьма ограниченном материале, не могут быть рекомендованы для внедрения в практику, требуют подтверждения на обширном материале и проведения апробации в условиях республики.

Литература.

1. Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А. Молекулярно-генетические маркеры в животноводстве // Биотехнология с.-х. животных. – СПб, 2002. – С. 52-56
2. Гудилин И.И., Петухов В.А., Дементьева Т.А. Прогнозирование продуктивности свиней по биохимическим, цитохимическим и математическим тестам // Интерьер и продуктивность свиней. – Новосибирск, 2000. – 225 с.
3. Шейко И.П., Елишко Т.И. Результаты использования ДНК-технологии для оценки полиморфизма гена RYR1 свиней белорусской мясной породы // Зоотехническая наука Беларуси: Сб. науч. тр. – Мн.: УП «Технопринт», 2003. – Т. 38. – С. 69-73

4. Епишко Т.И., Калашникова Л.А., Рыжова Н.В. ДНК-диагностика стрессустойчивости свиней белорусской мясной породы // Зоотехническая наука Беларуси: Сб. науч. тр. – Мн.: УП «Технопринт», 2003. – Т. 38. – С. 69-73
5. Калашникова Л.А., Дунин И.М., Глазко В.И. и др. ДНК-технологии оценки сельскохозяйственных животных. – Лесные Поляны, 1999. – 148 с.
6. Лобан Н.А. Использование методов ДНК-технологий в селекции свиней // Современные достижения и проблемы биотехнологии с.-х. животных: Материалы мед. науч. конф. – Дубровицы, 2002. – С. 148-150
7. Смирнов А.Ф., Никитин Н.С. Картирование и маркирование геномов животных // Вестн. РАСХН. – 2220. – № 1. – С. 53-56.
8. Hardge T., Scholz. A Faculty of Agriculture and Horticulture, Institute of Basic Animal Science, Humbolt- Unibersity. – Berlin, 2001.
9. Kaminski S., Rusc A., Wojtasik K. Simultaneous identification of ryanodine receptor 1 (RYR1) and estrogen receptor (ESR) genotypes with multiplex PCR-RFLP method in Polish Large White and Polish Landrace pigs // J.appl. Genet. – 2002. – Vol. 43. – № 3. – P. 331-335
10. Koswin-Podsiadla M., Przybylski W. The comparison between RYR1^c RYR^c and RYR1cRYRt pigs for meat quality and glycolytic potential measured before and after slaughter // Ann. Anim. Sci. – 2001. – Vol. 1. – № 2. – P. 31-36
11. A.G. de Vries et al. Роль основных генов и ДНК технологий в селекции свиней по качеству мяса // Meat Science. – 1998. – Vol. 48. – P. 245-255
12. Kmiec V., Drowak J Relations between the polymorphism in the ryanodine receptor gene (RYR1) and certain reproductive traits of sows in a herd of Polish Landrace pigs // Anim. Sci.Papers Rep. – Warsaw, 2000. – Vol. 18. – № 4. – P. 277-283

УДК 636.2.082.591.15.16

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДЫ ДЛЯ РАЗМОРАЖИВАНИЯ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

И.М. ЯРЕМЧУК

С.Г. ШАЛОВИЛЮ, доктор сельскохозяйственных наук

Н.М. ШАРАН, кандидат биологических наук

Институт биологии животных УААН, г. Львов, Украина

Резюме. Изучали действие фосфолипидов на жизнеспособность и приживляемость деконсервированных эмбрионов крупного рогатого скота. Установлено, что применение после деконсервации эмбрионов краткосрочного культивирования в культуральной среде с фосфолипидным препаратом «Филомек» способствует восстановлению физиологических функций эмбрионов и повышает их приживляемость у реципиентов.

Ключевые слова: деконсервация, эмбрионы КРС, криопротекторы, фосфолипиды, регенерация, культивирование, среда.

Введение. Изучение сохранности деконсервированных эмбрионов является чрезвычайно актуальным, поскольку недостаточно литературных данных по проблемам, которые возникают при криоконсервировании биологических объектов сверхбыстрым методом. Основным этапом, который отвечает за морфологическую целостность криокон-