

DOI: 10.1016/0093-691x(86)90143-3.

4. Barth, A. D. The relationship between sperm abnormalities and fertility / A. D. Barth // Proceedings of the 14th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction National Association of Animal Breeders, Milwaukee, 1992. – P. 47-63.

5. Dejamette, J. M. Accessory sperm: their importance to fertility and embryonic quality, an attempt to alter their numbers in artificially inseminated cattle / J. M. Dejamette, R. G. Saacke, J. Bame, C. J. Vogler // Journal of Animal Science. – 1992. – Vol. 70(2). – P. 484-491. – DOI: 10.2527/1992.702484x.

6. Iodixanol density gradient centrifugation for selecting stallion sperm for cold storage and cryopreservation / G. Stuhmann, H. Oldenhof, P. Peters [et.al.] // Anim. Reprod. Sci. – 2012. – Vol. 133(3-4). – P. 184–90. – DOI: 10.1016/j.anireprosci.2012.06.017.

7. Effect of Density-Gradient Sperm Separation Technique on In Vitro Fertilization Potential of Water Buffalo Semen with Low Post-Thaw Motilities / D. Hufana-Duran, P. G. Duran, Y. Kanai [et.al.] // Philippine Agricultural Scientist. – 2005. – Vol. 88(4). – P. 476-483.

8. Morrell, J. M. Update on semen technologies for animal breeding / J. M. Morrell // Reprod. Domest. Anim. – 2006. – Vol. 41(1). – P. 63–7. – DOI: 0.1111/j.1439-0531.2006.00621.x.

9. Morrell, J. M. Biometric techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review / J. M. Morrell, H. Rodriguez-Martinez // The Open Andrology J. – 2009. – Vol. 1. – P. 1–9.

10. Single and double layer centrifugation improve the quality of cryopreserved bovine sperm from poor quality ejaculates / A. Gloria, A. Carluccio, L. Wegher [et.al.] // Journal of Animal Science and Biotechnology. – 2016. – Vol. 7. – P. 30. – DOI: 10.1186/s40104-016-0088-6

11. Single- and two-layer gradient centrifugation in sperm separation: comparison and appraisal / QZ Zhou, CQ Feng, YG Zou [et. al.] // Zhonghua Nan KeXue. – 2010. – Vol. 16(3). – P. 217-219.

Поступила 17.03.2025 г.

УДК 636.4-047.44:577.213.7

М.А. КОВАЛЬЧУК, В.П. СИМОНЕНКО, А.И. ГАНДЖА,
Н.В. ЖУРИНА, Л.Л. ЛЕТКЕВИЧ

ДНК-ТЕСТИРОВАНИЕ СВИНЕЙ ПО ГЕНАМ PRLR И FSHB МЕТОДОМ ПЦР-ПДРФ

*Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси
по животноводству, г. Жодино, Республика Беларусь*

Внедрение эффективных селекционно-генетических и биологических методов в селекционный процесс способствует совершенствованию отечественных пород и линий свиней. Использование ДНК-маркеров является перспективным методом для изучения признаков, имеющих низкую наследуемость и проявления, ограниченные полом. В статье представлены результаты исследований, в которых изучалась генетическая информация генов: пролактинового рецептора (PRLR), фолликулостимулирующего гормона (FSHB) с целью установления предпочтительных для селекции генотипов детерминирующих репродуктивные

качества свиней различных пород, разводимых в племенных предприятиях Беларуси, и их использования в селекционно-племенной работе. Проведено генотипирование свиней по изучаемым генам методом ПЦР-ПДРФ. Было установлено, что полиморфизм генов PRLR, FSHB наблюдался у всех племенных животных, принадлежащих к пяти породам.

Ключевые слова: генотипирование, свиньи, ДНК-маркеры, породы, селекционно-гибридные центры, полиморфизм, хряки-производители, ремонтные хрячки, генотипы, концентрация, частота, аллель, генетическая структура, селекция, продуктивные признаки.

M.A. KOVALCHUK, V.P. SIMONENKO, A.I. GANDZHA,
N.V. ZHURINA, L.L. LETKEVICH

DNA TESTING OF PIGS FOR PRLR AND FSHB GENES BY PCR-RFLP METHOD

*Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences
of Belarus for Animal Breeding, Zhodino, Republic of Belarus*

Implementation of effective selection-genetic and biological methods in the selection process contributes to the improvement of native breeds and lines of pigs. The use of DNA markers is a promising method for studying traits that have low heritability and sex-limited manifestations. This paper contains the results of research in which the genetic information of prolactin receptor (PRLR), follicle-stimulating hormone (FSHB) genes was studied in order to establish genotypes preferred for selection, determining the reproductive traits of pigs of various breeds bred at breeding enterprises of the Republic of Belarus, and their use in selection and breeding work. Genotyping of pigs for the studied genes was carried out using the PCR-RFLP method. Polymorphism of PRLR, FSNB genes was observed in all breeding animals belonging to five breeds.

Key words: genotyping, pigs, DNA markers, breeds, selection and hybrid centers, polymorphism, stud boars, replacement boars, genotypes, concentration, frequency, allele, genetic structure, selection, productivity traits.

Введение. Современное свиноводство, как в нашей республике, так и за рубежом, развивается и совершенствуется на основе достижений науки и техники. Новые открытия в молекулярной генетике позволяют выделять и изучать специальные участки генома, которые влияют на важные продуктивные признаки (воспроизводительные, откормочные, мясные). Использование ДНК-маркеров является перспективным методом для признаков, имеющих низкую наследуемость и проявления, ограниченные полом, таких как репродуктивные признаки. Внедрение эффективных селекционно-генетических и биологических методов в селекционный процесс способствует совершенствованию отечественных пород и линий свиней.

Исследования, направленные на изучение генетических маркеров детерминирующих продуктивные признаки свиней, требуют дифференцированного подхода и зависят от породной принадлежности, генетической структуры популяций и конкретной селекционной задачи. Важным критерием увеличения производства мяса и эффективности селекции свиней является повышение продуктивности свиноматок, а также оплодотворяющей способности хряков-производителей. В нашей республике потребность селекционной практики в эффективном использовании ДНК-маркирования животных возрастает с каждым годом, что обуславливает актуальность научных исследований в данной области. Результаты зарубежных исследований свидетельствуют, что использование ДНК-маркеров в селекции позволяет повысить продуктивные качества животных до 20 % [1, 2].

В селекции всё ещё недостаточно используются результаты молекулярно-генетического анализа, часть племенных животных остаётся не исследованной. В настоящее время известен ряд генов-маркеров, ассоциированных с воспроизводительными качествами, которые применяются в селекции свиней: ген эстрогенового рецептора (ESR), ген пролактинового рецептора (PRLR), ген фолликулостимулирующего гормона (FSHB), ген лейкемия-ингибирующего фактора (LIF), ген белка связывающего ретинол (RBP4), ген коактиватора 1 ядерных рецепторов (NCOA1) и т. д. Влияние данных генов на признаки воспроизводства (размер гнезда, многоплодие, молочность, количество живых поросят при отъеме, качественные показатели спермопродукции и др.) подтверждено зарубежными исследователями [3, 4, 5].

В нашей научно-исследовательской работе изучалась генетическая информация генов: пролактинового рецептора (PRLR), фолликулостимулирующего гормона (FSHB) с целью установления предпочтительных для селекции генотипов детерминирующих репродуктивных качества свиней различных пород, разводимых в Беларуси, и их использования в селекционно-племенной работе.

Материал и методика исследований. Исследования проводились в лаборатории молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству». Базовыми хозяйствами были: ОАО «СГЦ «Заднепровский» Витебской, ОАО «СГЦ «Западный» Брестской, ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита» Минской, УП «Полесье-Агроинвест» Гомельской, ОАО «Племзавод «Тимоново» Могилёвской областей. Объектом исследования для проведения генетического тестирования по генам PRLR и FSHB являлись свиньи пород: белорусской крупной белой (БКБ), белорусской мясной (БМ), ландрас (Л), дюрок (Д), йоркшир (Й).

Препараты ДНК экстрагировались перхлоратным методом из образцов эпителиальной ткани свиней [7, 8] и набором реагентов «Нуклеосорб С» («Праймтех», Беларусь). Концентрация и степень чистоты препаратов ДНК определялись с использованием спектрофотометра GeneQuant 1300 (Healthcare). Оценка полиморфизма изучаемых генов PRLR и FSHB проводилась методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция-полиморфизм длин рестрикционных фрагментов).

Для ПЦР гена PRLR использовали праймеры следующих последовательностей:

PRLR F: 5' - CGTGGCTCCGTTTGAAGAACC - 3',

PRLR R: 5' - CTGAAAGGAGTGCATAAAGCC - 3'.

ПЦР амплификации проводили по программе: «горячий старт» – 94 °C – 2 мин.; 35 циклов: денатурация – 94 °C – 30 сек., отжиг – 59 °C – 1 мин., синтез – 72 °C – 30 сек., достройка – 72 °C – 5 мин.

Для ПЦР гена FSHB использовали праймеры следующих последовательностей:

FSHB F: 5' - AGTTCTGAAATGATTTTTTCGGG - 3',

FSHB R: 5' - TTTGCCATTGACTGTCTTAAAGG - 3'.

ПЦР амплификации проводили по программе: «горячий старт» – 94 °C – 2 мин.; 35 циклов: денатурация – 95 °C – 30 сек., отжиг – 56 °C – 30 сек., синтез – 72 °C – 30 сек., достройка – 72 °C – 5 мин.

ПЦР проводилась в термоциклерах «Sure Cyclер 8800» и «MJ Mini» («Bio-Rad», США).

Продукты ПЦР-ПДРФ разделялись электрофоретически в 2-4 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, при напряжении 130В в течение 20-50 мин. В качестве маркера использовался ДНК-маркер молекулярного веса M100bp. Фракции нуклеиновых кислот в гелях визуализировались в проходящем ультрафиолетовом свете с длиной волны 260 нм с использованием компьютерной видеосистемы Infinity-3026 (Vilber Lourmat, Франция).

При проведении анализа ПДРФ продукты ПЦР генов PRLR и FSHB подвергались рестрикционно-энзиматическому гидролизу, соответствующими рестриктазами – AluI и HaeIII, в течение 2-3 часов при температуре 37 °C. После чего образующиеся рестрикционные фрагменты разделялись в 2-3 % агарозном геле.

Результаты исследований и их обсуждение. Изучена генетическая структура по двум генам PRLR и FSHB популяций хряков-производителей и ремонтных хрячков пород ландрас, йоркшир, белорусская крупная белая, белорусская мясная и дюрок (таблица 1 и 2).

Наибольший интерес для селекции свиней представляют животные, имеющие генотипы PRLR^{AA} и PRLR^{AB}, которые ассоциированы с более высокими воспроизводительными качествами у хряков.

Таблица 1 – Генетическая структура по гену PRLR популяций хряков-производителей различных пород

Хозяйство	n	Частота встречаемости генотипов, %			Частота встречае- мости аллелей	
		PRLR AA	PRLR AB	PRLR ^{BB}	PRLR ^A	PRLR ^B
Ландрас						
ОАО «СГЦ «Заднепров- ский»	22	-	50,00	50,00	0,250	0,750
УП «Поле- сье-Агроин- вест»	7	42,86	57,14	-	0,714	0,286
Йоркшир						
ОАО «СГЦ «Западный»	28	10,71	67,86	21,43	0,446	0,554
УП «Поле- сье-Агроин- вест»	4	50,00	25,00	25,00	0,625	0,375
Белорусская крупная белая						
ОАО «Плем- завод «Тимо- ново»	32	25,00	46,88	28,12	0,484	0,516
Белорусская мясная						
ГП «Жоди- ноАгро- ПлемЭлита»	11	45,45	45,45	9,10	0,682	0,318

Анализ данных показал, что частота встречаемости генотипа PRLR^{AA} и аллеля PRLR^A колебалась в зависимости от породы и популяции и находилась в пределах от 10,71 % и 0,446 (хряки породы йоркшир, ОАО «СГЦ «Западный») до 50,00 % и 0,625 (хряки породы йоркшир, УП «Полесье-Агроинвест») соответственно. Популяция породы ландрас (ОАО «СГЦ «Заднепровский») характеризовалась отсутствием генотипа PRLR^{AA}. Около пятидесяти процентов хряков имели генотип PRLR^{AA}: выборка хряков-производителей породы ландрас из УП «Полесье-Агроинвест» – 42,86 % и белорусской мясной породы из ГП «Жоди-ноАгроПлемЭлита» – 45,45 %. Частота встречаемости животных носителей гетерозиготного генотипа PRLR^{AB} изменялась от 25,00 % (йоркшир, УП «Полесье-Агроинвест») до 67,86 % (йоркшир, ОАО «СГЦ «Западный»). Промежуточным значением характеризовались хряки белорусской мясной породы – 45,45 % (ГП «Жоди-ноАгроПлемЭлита»), хряки белорусской крупной белой породы – 46,88 % (ОАО «Племзавод «Тимоново»), две популяции хряков породы ландрас –

50,00 и 57,14 % (ОАО «СГЦ «Заднепровский» и УП «Полесье-Агроинвест»).

Изучена генетическая структура нескольких популяций ремонтных хрячков пород дюрок, йоркшир, ландрас, белорусская мясная (таблица 2).

Таблица 2 – Генетическая структура по гену PRLR популяций ремонтных хрячков различных пород

Хозяйство	n	Частота встречаемости генотипов, %			Частота встречае- мости аллелей	
		PRLR AA	PRLR AB	PRLR ^{BB}	PRLR ^A	PRLR ^B
Дюрок						
ГП «Жодино-АгроПлемЭ- лита»	5	40,00	60,00	-	0,700	0,300
ОАО «СГЦ «Заднепров- ский»	27	22,22	62,96	14,82	0,537	0,463
Ландрас						
ГП «Жодино-АгроПлемЭ- лита»	8	50,00	37,50	12,50	0,688	0,312
УП «Полесье-Агроинвест»	14	64,29	35,71	-	0,821	0,179
Йоркшир						
ГП «Жодино-АгроПлемЭ- лита»	9	-	33,33	66,67	0,167	0,833
УП «Полесье-Агроинвест»	7	71,43	28,57	-	0,857	0,143
Белорусская мясная						
ОАО «СГЦ «Заднепров- ский»	19	52,63	42,11	5,26	0,737	0,263

Данные таблицы 2 свидетельствуют о том, что размах встречаемости генотипа PRLR^{AA} и аллеля PRLR^A колебался от 0 % и 0,167 (хрячки породы йоркшир, ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита») до 71,43 % и 0,857 (хрячки породы йоркшир, УП «Полесье-Агроинвест») соответственно. Концентрация гомозиготного генотипа PRLR^{AA} в остальных популяциях хрячков составила по породам: дюрок – 22,22 и 40,00 %, ландрас – 50,00 и 64,29 %, белорусская мясная – 52,63 %. Встречаемость гетерозиготного генотипа PRLR^{AB} находилась в пределах от 28,57 % (порода йоркшир, УП «Полесье-Агроинвест») до 62,96 % (порода дюрок, ОАО

«СГЦ «Заднепровский»).

В таблице 3 представлены результаты анализа генетической структуры по гену PRLR изученных пород в среднем. Показатели частоты встречаемости генотипа PRLR^{AA} и аллеля PRLR^A варьировал от 20,83 % и 0,469 (порода йоркшир) до 50,00 % и 0,717 (белорусская мясная порода) соответственно. Высокий показатель частоты встречаемости установлен для гетерозиготного генотипа PRLR^{AB}, который находился в пределах от 43,33 % (белорусская мясная порода) до 62,50 % (порода дюрок).

Таблица 3 – Генетическая структура по гену PRLR различных пород свиней

Порода	n	Частота встречаемости генотипов, %			Частота встречаемости аллелей	
		PRLR ^{AA}	PRLR ^{AB}	PRLR ^{BB}	PRLR ^A	PRLR ^B
Дюрок	32	25,00	62,50	12,50	0,563	0,437
Ландрас	1	31,37	45,10	23,53	0,539	0,461
Йоркшир	48	20,83	52,08	27,09	0,469	0,531
Белорусская крупная белая	32	25,00	46,88	28,12	0,484	0,516
Белорусская мясная	30	50,00	43,33	6,67	0,717	0,283

Изучена генетическая структура популяций хряков-производителей по гену FSHB (таблица 4). Для селекции свиней на повышение показателей воспроизводительных признаков представляет интерес генотип FSHB^{BB}.

Таблица 4 – Генетическая структура по гену FSHB популяций хряков-производителей различных пород

Хозяйство	n	Частота встречаемости генотипов, %			Частота встречаемости аллелей	
		FSHB ^{AA}	FSHB ^{AB}	FSHB ^{BB}	FSHB ^A	FSHB ^B
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>	<i>7</i>
Ландрас						
ОАО «СГЦ «Заднепровский»	22	9,09	54,55	36,36	0,364	0,636
УП «Полесье - Агроинвест»	7	-	14,29	85,71	0,071	0,929
Йоркшир						
ОАО «СГЦ «Западный»	25	-	16,00	84,00	0,080	0,920

1	2	3	4	5	6	7
УП «Полесье-Агроинвест»	4	-	75,00	25,00	0,375	0,625
Белорусская крупная белая						
ОАО «Племзавод «Тимоново»	32	-	15,63	84,37	0,078	0,922
Белорусская мясная						
ГП «Жодино АгроПлемЭлита»	11	-	63,64	36,36	0,318	0,682

Анализ генетической структуры по гену FSHB показал, что частота встречаемости генотипа FSHB^{BB} и аллеля FSHB^B находилась в пределах от 25,00 % и 0,625 (хряки породы йоркшир, УП «Полесье-Агроинвест») до 85,71 % и 0,929 (хряки породы ландрас, УП «Полесье-Агроинвест») соответственно. Популяции хряков породы йоркшир (ОАО «СГЦ «Западный») и белорусской крупной белой породы (ОАО «Племзавод «Тимоново») характеризовались высоким уровнем встречаемости гомозиготного генотипа FSHB^{BB} и аллеля FSHB^B со значениями 84,00 % и 0,920, 84,37 % и 0,922 соответственно.

Изучена генетическая структура популяций ремонтных хрячков по гену FSHB (таблица 5).

Таблица 5 – Генетическая структура по гену FSHB популяций ремонтных хрячков различных пород

Хозяйство	n	Частота встречаемости генотипов, %			Частота встречаемости аллелей	
		FSHB ^{AA}	FSHB ^{AB}	FSHB ^{BB}	FSHB ^A	FSHB ^B
1	2	3	4	5	6	7
Дюрок						
ГП «Жодино АгроПлемЭлита»	5	-	20,00	80,00	0,100	0,900
ОАО «СГЦ «Заднепровский»	27	-	-	100	-	1,00
Ландрас						
ГП «Жодино АгроПлемЭлита»	6	-	33,33	66,67	0,167	0,833
УП «Полесье-Агроинвест»	11	-	-	100	-	1,00

1	2	3	4	5	6	7
Йоркшир						
ГП «Жодино АгроПлемЭ- лита»	9	-	22,22	77,78	0,111	0,889
УП «Полесье- Агроинвест»	7	-	14,29	85,71	0,071	0,929
Белорусская мясная						
ОАО «СГЦ «Заднепров- ский»	19	-	31,58	68,42	0,158	0,842

Результаты генотипирования ремонтных хрячков по гену FSHB показали, что размах частот встречаемости предпочтительного генотипа FSHB^{BB} и аллеля FSHB^B в популяциях находился в пределах от 66,67 % и 0,833 (порода ландрас, ГП «ЖодиноАгроПлемЭлита») до 100 % и 1,0 (порода дюрок, ОАО «СГЦ «Заднепровский» и порода ландрас, УП «Полесье-Агроинвест») соответственно.

Промежуточное значение частоты встречаемости генотипа FSHB^{BB} имели ремонтные хрячки пород: белорусская мясная – 68,42 %, две популяции йоркшир – 77,78 и 85,71 %, дюрок – 80,00 %.

Анализ генетической структуры по гену FSHB пород в целом по изучаемым породам представлен в таблице 6.

Таблица 6 – Генетическая структура по гену FSHB различных пород свиней

Порода	n	Частота встречаемости генотипов, %			Частота встречаемости аллелей	
		FSHB ^{AA}	FSHB ^{AB}	FSHB ^{BB}	FSHB ^A	FSHB ^B
Дюрок	32	-	3,12	96,88	0,016	0,984
Ландрас	6	4,35	32,61	63,04	0,207	0,793
Йоркшир	45	-	22,22	77,78	0,111	0,889
Белорусская крупная белая	32	-	15,62	84,38	0,078	0,922
Белорусская мясная	30	-	43,33	56,67	0,217	0,783

Наибольший процент встречаемости животных с предпочтительным генотипом FSHB^{BB} наблюдался у популяций породы дюрок – 96,88 %. Наименьшей концентрацией генотипа FSHB^{BB} характеризовались популяции белорусской мясной породы – 56,67 %.

Заключение. Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что полиморфизм генов PRLR, FSHB выявлен у всех исследованных породах свиней и средние значения частот встречаемости предпочтительных генотипов и аллелей составили:

- порода дюрок: $PRLR^{AA} - 25,00 \%$, $PRLR^{AB} - 62,50 \%$, $PRLR^A - 0,563$; $FSHB^{BB} - 96,88 \%$, $FSHB^B - 0,984$;
- порода ландрас: $PRLR^{AA} - 31,37 \%$, $PRLR^{AB} - 45,10 \%$, $PRLR^A - 0,539$; $FSHB^{BB} - 63,04 \%$, $FSHB^B - 0,793$;
- порода йоркшир: $PRLR^{AA} - 20,83 \%$, $PRLR^{AB} - 52,08 \%$, $PRLR^A - 0,469$; $FSHB^{BB} - 77,78 \%$, $FSHB^B - 0,889$;
- белорусская крупная белая порода: $PRLR^{AA} - 25,00 \%$, $PRLR^{AB} - 46,88 \%$, $PRLR^A - 0,484$; $FSHB^{BB} - 84,38 \%$, $FSHB^B - 0,922$;
- белорусская мясная порода: $PRLR^{AA} - 50,00 \%$, $PRLR^{AB} - 43,33 \%$, $PRLR^A - 0,717$; $FSHB^{BB} - 56,67 \%$, $FSHB^B - 0,783$.

Для селекции предпочтительными являются животные с генотипами $PRLR^{AA}$ и $PRLR^{AB}$, $FSHB^{BB}$.

Литература

1. Калашникова, Л. А. Селекция XXI века: использование ДНК-технологий / Л. А. Калашникова, И. М. Дунин, В. И. Глазко. – Лесные Поляны : ВНИИПлем, 2000. – 31 с. – ISBN 5-87958-129-2.
2. Генофонды сельскохозяйственных животных. Генетические ресурсы животноводства России / И. Г. Моисеева, С. В. Уханов, Ю. А. Столповский [и др.] ; РАН, Ин-т общей генетики им. Н.И. Вавилова. – Москва : Наука, 2006. – 462 с. – ISBN 5-02-035646-8.
3. Rothschild, M. F. Candidate gene analysis to detect traits of economic importance in domestic livestock / M. F. Rothschild, M. Soller // Probe. – 1997. – Vol. 8. – P. 13-20.
4. Rothschild, M. F. Molecular approaches to improved pig fertility / M. F. Rothschild, L. A. Messer, A. Vincent // J Reprod. Fertil. – 1997. – Vol. 52 (Suppl). – P. 277-236.
5. Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine / R. Linville, D. Pomp, R. Johnson, M. Rothschild // J. Anim. Sc. – 2001. – Vol. 79. – P. 60–67. doi: 10.2527/2001.79160x.
6. Методические рекомендации по использованию метода оценки племенных свиней по генам, ассоциированным с признаками продуктивности / И. П. Шейко, М. А. Ковальчук, В. П. Симоненко [и др.]. – Жодино, 2023. – 27 с.
7. Методические рекомендации по применению ДНК-тестирования в животноводстве Беларуси / И. П. Шейко, Т. И. Елишко, О. П. Курак [и др.]. – Жодино, 2006. – 26 с.

Поступила 28.02.2025 г.