



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **66984** (13) **U**  
(51) МПК (2011.01)  
A01K 67/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЛОДЮЧОСТІ СВИНЕЙ ЗА ДОПОМОГОЮ ЦИТОГЕНЕТИЧНИХ ТА ДНК-МАРКЕРІВ**

1

2

(21) u201108732

(22) 11.07.2011

(24) 25.01.2012

(46) 25.01.2012, Бюл.№ 2, 2012 р.

(72) КОСТЕНКО СВІТЛАНА ОЛЕКСІЇВНА, ДРАГУ-  
ЛЯН МАРІЯ ВАЛЕРІЇВНА, СИДОРЕНКО ОЛЕНА  
ВАСИЛІВНА

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУР-  
СІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

**(57)** Спосіб прогнозування плодючості свиней за допомогою цитогенетичних та ДНК-маркерів, який **відрізняється** тим, що як маркери застосовують комплекс генів відповідальних за відтворні функції: рецептор фолікулостимулюючого гормону (FSHR), коактиватор ядерних рецепторів стероїдних гормонів (NCOA1), рецептор естрогену (ESR), рецептор пролактину (PRLR) та враховують стабільність геному за рівнем лімфоцитарних клітин з мікроядрами (МЯ).

Корисна модель належить до галузі сільського господарства, зокрема до свинарства, а саме до розведення, селекції та генетики свиней.

Найближчий аналог корисної моделі є спосіб (патент № 49700, опубл. 11.05.2010, бюл. № 9, МПК A01K 1/00. Спосіб визначення хромосомної стабільності та транслокацій, що контролюють високу багатоплідність у свиней миргородської породи. Войтенко С.Л., Дзіцюк В.В.), згідно якого з використанням цитогенетичних досліджень виявляють стабільність генотипу та генетичні аномалії та їх вплив на підвищення багатоплідності у свиноматок.

Недоліки використання способу в селекції та генетиці свиней при плануванні багатоплідності тварин обумовлені тим, що враховується тільки фактор стабільності геному, але не враховується комплекс генів, що відповідають за відтворні функції: рецептору фолікулостимулюючого гормону (FSHR), коактиватора ядерних рецепторів стероїдних гормонів (NCOA1), рецептору естрогену (ESR), рецептору пролактину (PRLR).

В основу пропонуваної корисної моделі поставлена задача розробити спосіб комплексної оцінки відтворної здатності свиней.

Поставлена задача досягається тим, що для комплексної оцінки свиней за репродуктивними якостями використовують цитогенетичні та молекулярно генетичні маркери, беручи за ДНК-маркери гени FSHR, NCOA1, ESR та PRLR.

Заявлений спосіб здійснюється наступним чином.

Цитогенетичний аналіз крові свиней проводили згідно з інструкцією з проведення цитогенетичного контролю племінних тварин.

Для отримання препаратів метафазних хромосом кров свиноматок культивують у живильному середовищі 199 з фітогемаглютенином протягом 48 годин, останні 3 години - з колхіцином.

Цитогенетичний аналіз проводять на пофарбованих за методом Гімза препаратах хромосом та дивляться під олійною імерсією зі збільшенням  $\times 1000$ . При аналізі враховують рівень клітин з мікроядрами (МЯ).

Для ампліфікації фрагментів генів FSHR, NCOA1, ESR, PRLR використовують праймери, що представлені в таблиці 1. Режими ампліфікації генів наведені у таблиці 2.

(13) **U**  
(11) **66984**  
(19) **UA**

Таблиця 1

## Послідовності праймерів

Локуси	Послідовність	
FSHR	F	GCA ACA AAT CTA TTT TAA GGC AAG A
	R	GAT GCT CAC CTT CAT GTA GCT G
NCOAI	F	AGG GGC TAC CCT CCT GTA AG
	R	CTT CTC TGC CAG TTC TCC AGT C
ESR	F	CCT GTT TTT ACA GTG ACT TTT ACA GAG
	R	CAC TTC GAG GGT CAG TCC AAT TAG
PRLR	F	CGT GGC TCC GTT TGA AGA ACC
	R	CTG AAA GGA GTG CAT AAA GCC

Таблиця 2

## Параметри ампліфікації

Для ампліфікаторів з активним регулюванням температури (за об'ємом рідини в пробірці –10 мкл)			
Етапи ампліфікації	Температура	Час	Кількість циклів
1	2	3	4
FSHR			
Початкова денатурація ДНК	94 °C	3 хв	1
Денатурація	94 °C	30 с	8
Відпал праймерів	65 °C	30 с	
	72 °C	30 с	
Синтез	94 °C	30 с	27
	57 °C	30 с	
	72 °C	30 с	
Фінальний синтез	72 °C	5 хв	1
	4 °C	Зберігання	
NCOAI			
Початкова денатурація ДНК	94 °C	3 хв	1
Денатурація	94 °C	30 с	8
Відпал праймерів	63 °C	30 с	
	72 °C	30 с	
Синтез	94 °C	30 с	32
	55 °C	30 с	
	72 °C	30 с	
Фінальний синтез	72 °C	5 хв	1
	4°	Зберігання	
ESR			
Початкова денатурація ДНК	94 °C	5 хв	1
Денатурація	94 °C	45 с	31
Відпал праймерів	55 °C	1 хв	
Синтез	72 °C	1 хв	
Фінальний синтез	72 °C	8хв	1
	4 °C	Зберігання	
PRLR			
Початкова денатурація ДНК	93 °C	3 хв	1
Денатурація	93 °C	30 с	35
Відпал праймерів	60 °C	1 хв	
Синтез	72 °C	1 хв	
Фінальний синтез	72 °C	3 хв	1
	4 °C	Зберігання	

Для рестриктного гідролізу ампліфікованих фрагментів використовують ферменти рестрикції Rsa I для гену NCOAI, Pvu II, для гену ESR та Alu I для гену PRLR. Ген FSHR генотипується методом Bi-Passa без додавання рестриктази. Зразки інкубують протягом 12-16 годин при 37 °C (або близь-

ко 3 годин додавши в два рази більше ферменту). По закінченню проводять електрофоретичний аналіз продуктів рестрикції.

Під час ДНК-ідентифікації свиней за геном FSHR генотип CC має такі рестрикційні розміри 674 та 280 п.н, CT - 61 A, 442 та 280 п.н., TT - 61 A,

442п.н. Під час ДНК-ідентифікації свиней за геном NCOAI після обробки рестриктазою Rsa I, генотип A1A1 характеризується наявністю продуктів розмірами 440 п.н., A1A2 - 440, 282 та 158 п.н., A2A2 - 282 та 158 п.н. відповідно. Під час ДНК-ідентифікації свиней за геном ESR після обробки рестриктазою Pvu II, генотип AA дає фрагмент розміром 120п.н, AB - 120 і 55 п.н., а генотип BB - 55 п.н. відповідно. Рестриктаза Alu I за геном PRLR ріже генотип на наступні фрагменти розміром AA - 85, 59 та 19 п.н., AB - 104, 85, 59 та 19 п.н., BB - 104 та 59 п.н.

Виявлено частоти алелей та генотипів генів FSHR, NCOAI, ESR, та PRLR у тварин української м'ясної та уельської порід.

Частота тварин з бажаним генотипом CC гена FSHR склала 56 % в української м'ясної породи та 57 % в уельської породи. На долю тварин з бажаним генотипом A1A1 гена NCOAI припадає 75 % свиноматок уельської породи та 46 % свиноматок української м'ясної породи. Частота бажаного алеля B та генотипу BB гену ESR у свиноматок уельської породи становила 40 % та 2 % відповідно, у свиноматок української м'ясної породи становила 48 % та 10 % відповідно. Частота бажаного алеля A та генотипу AA гену PRLR у свиноматок уельської породи становила 53,1 % та 34,4 % відповідно, у свиноматок української м'ясної породи становила 58,06 % та 51,6 % відповідно.

Встановлено достовірну перевагу свиноматок з бажаними та проміжними генотипами по чотирьох генам (FSHR/NCOAI/ESR/PRLR) над тваринами з генотипами TT/A2A2/AA/BB (FSHR/NCOAI/ESR/PRLR) на 0,9 голів по багатоплідності, 0,63 голів по показникам народження живих поросят та 0,25 голів по показникам поросят при відлученні.

Виявлено перевагу свиноматок уельської та української м'ясної порід з генотипами CC над генотипом TT гену FSHR по багатоплідності на 0,3 та 1,3 поросят при опоросі відповідно.

Встановлено перевагу свиноматок української м'ясної та уельської порід генотипу A1A1 над тва-

ринами з генотипом A2A2 по багатоплідності на 0,7 та 0,4 поросят в опоросі відповідно.

Аналіз даних по багатоплідності свиноматок уельської та української м'ясної порід при першому опоросі виявив перевагу тварин з генотипом BB над свинями з генотипом AA по гену ESR на 0,9 та 1,0 поросят відповідно.

Виявлено перевагу свиноматок уельської та української м'ясної порід з генотипами AA над генотипом BB гену PRLR по багатоплідності на 1,0 та 0,5 поросят в опоросі відповідно.

Нами проведено цитогенетичне дослідження. При збільшенні мікроядер (МЯ) у тварин з бажаним та проміжним генотипом відмічалось зменшення багатоплідності з кореляцією  $r=-0,30$  та зменшувався відсоток збереженості потомства з кореляцією  $r=-0,48$  ( $0,99>P>0,95$ ).

Для розробки селекційної стратегії нами пропонується побудова маркерних профілів свиней, в яких відображені генотипи тварин за цитогенетичними та ДНК-маркерами. При врахуванні цитогенетичних показників відбирались свиноматки зі стабільним геномом та без хромосомних мутацій.

Маркерні профілі з бажаним та проміжним генотипами по генам FSHR/NCOAI/ESR/PRLR для свиноматок української м'ясної та уельської порід нами представлені у таблиці 3.

При збільшенні рівня МЯ у свиноматок уельської породи з бажаним та проміжними генотипами відмічалось зменшення багатоплідності зі слабкою зворотною кореляцією  $r=-0,30$  та відсотку збереженості потомства зі слабкою зворотною кореляцією  $r=-0,29$  ( $0,999>P>0,99$ ).

У свиноматок української м'ясної породи з бажаним та проміжним генотипами при збільшенні МЯ зменшувався відсоток збереженості потомства з середньою зворотною кореляцією  $r=-0,40$  ( $0,999>P>0,99$ ).

Для встановлення зв'язку кількості клітин з мікроядрами із багатоплідністю та збереженістю потомства у свиноматок небажаного генотипу уельської та української м'ясної породи нами було побудовано маркерний профіль, наведений у таблиці 4.

Таблиця 3

Зв'язок частоти клітин з мікроядрами із багатоплідністю та збереженістю потомства у тварин бажаного та проміжного генотипів

Ідентифікаційний номер	Родина	Показник МЯ	Багатоплідність	Збереженість
Уельська порода				
5144	Лайк Герл	7	11	89,00
6692	Лайк Мейд	3,91	11	89,00
8794	Дон Міст	5,25	13	87,00
1226	Лайк Мейд	3,4	9	91,00
1126	Імпоузін	4,83	10	90,00
8464	Емма	3,4	12	88,00
8518	Лайк Мейд	3,5	8	92,00
342	Лайк Герл	6,7	10	90,00
1030	Лайк Мейд	3,4	12	88,00
8462	Дон Міст	3,7	10	90,00

Продовження таблиці 3

354	Лайк Герл	5,5	13	87,00
4326	Лайк Мейд	5	10	90,00
8720	Лайк Герл	2,9	9,66	79,31
Українська м'ясна порода				
1518	Цапля	4,5	12	88,00
214	Цапля	4,56	11	89
66	Целіна	2	11,33	88,23
822	Цензура	3,2	10	86,66
700	Цапля	6,2	12,5	68
32	Цапля	3,2	9,8	83,67
824	Цензура	3,5	11	63,63
220	Цапля	4,6	10	90
708	Цензура	3,05	6	87
638	Целіна	1,55	11	89

У свиноматок уельської породи з небажаними генотипами спостерігався зв'язок рівня МЯ з показниками продуктивності, що виявлявся у зменшенні збереженості потомства при збільшенні кількості клітин з МЯ з середньою зворотною кореляцією  $r = -0,56$  ( $0,999 > P > 0,99$ ). При збільшенні

МЯ у свиноматок української м'ясної породи з небажаними генотипами відмічалось зменшення багатоплідності зі слабкою зворотною кореляцією  $r = -0,28$  ( $0,999 > P > 0,99$ ) та зменшувався відсоток збереженості потомства середньою зворотною кореляцією  $r = -0,46$  ( $0,999 > P > 0,99$ ).

Таблиця 4

Зв'язок рівня мікроядер із багатоплідністю та збереженістю потомства у тварин небажаних генотипів

Ідентифікаційний номер	Родина	Показник МЯ	Багатоплідність	Збереженість
Уельська порода				
4326	Лайк Мейд	5	10	90,00
1090	Лайк Герл	5,8	5	
8520	Імпоузін	4,6	12	88,00
356	Лайк Герл	5,3	12	88,00
6348	Лайк Герл	5	11	89,00
5614	Імпоузін	4,7	10	90,00
330	Імпоузін	3,98	7	93,00
8478	Дон Міст	5,2	12	88,00
8542	Емма	3,7	11	89,00
8514	Імпоузін	3,7	8	92,00
1000	Лайк Мейд	3,5	9	91,00
6512	Лайк Герл	4,8	11	89,00
8794	Дон Міст	5,28	11	89,00
1114	Лайк Герл	5,18	9	91,00
Українська м'ясна порода				
28	Цензура	5,9	5	10
446/776	Целіна	1,45	10	87,5
1074	Цапля	3,4	11	89
808	Цензура	3,4	6	100
850	Церера	4,6	14	86
852	Церера	4,2	10	89
230	Цапля	7,6	8	77,7

Виявлена нами достовірна кореляція між показниками продуктивності та рівнем МЯ тварин свідчить про те, що тварин слід відбирати не тільки на основі ДНК-маркерів, але слід ще враховувати стабільність геному свиней. Також з наших досліджень можна зробити висновок, що більш стабільний геном спостерігався у тварин з бажаними та проміжними генотипами по генам FSHR/NCOAI/ ESR/PRLR.

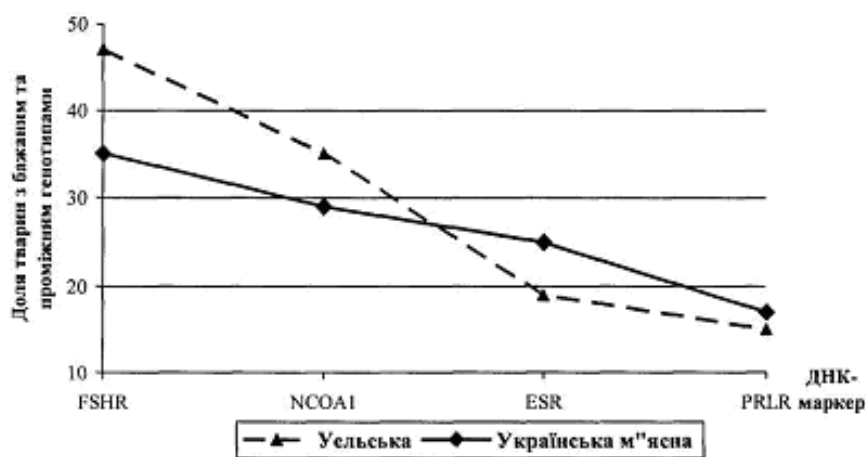
Кількість тварин для подальшого використання скорочується із збільшенням кількості маркерів, що використовуються для відбору. Так наприклад із 52 свиноматок уельської породи 47 тварин, що використовуються з бажаним та проміжним генотипами по FSHR, якщо враховувати ген NCOAI, то їх кількість зменшується до 35 по врахуванні чотирьох генів можна використовувати тільки 15 тварин, що складає 31,91 %, а в української м'ясної

серед 40 свиноматок використовується за бажаним та проміжним генотипами по FSHR 35 тварин, а якщо враховувати всі чотири гени - тільки 17 (48,57 %).

Результати порівняльної динаміки маркерної селекції свиноматок схематично представлені нами на фіг. - Порівняльна динаміка маркерної селекції свиноматок зі стабільним геномом за бажаним

та проміжним генотипом генів FSHR, /NCOAI/ ESR/ PRLR.

Таким чином, результати аналізу підтверджують ефективність використання комплексних генетичних маркерних досліджень для визначення та прогнозування тварин з бажаними генотипами та стабільним геномом, що підвищить багатоплідність свиней.



Фіг.