

УДК 577.21; 636.082
© 2010

Лядський І.К., аспірант*

Інститут свинарства ім. О.В. Квасницького НААН України

ОЦІНКА ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНІВ *MC4R* ТА *HMG1*, ЩО ВІДПОВІДАЮТЬ ЗА ФОРМУВАННЯ М'ЯСНИХ І ВІДГОДІВЕЛЬНИХ ОЗНАК У СВИНЕЙ ВЕЛИКОЇ БІЛОЇ ПОРОДИ

Рецензент – кандидат біологічних наук В.М. Балацький

Подано матеріали дослідження поліморфізму генів *mc4r* та *hmg1* серед свиней великої білої породи племінних господарств Полтавської та Сумської областей. Зроблені висновки стосовно можливості вивчення зв'язку цих генів із відгодівельними якостями свиней для подальшої маркерної селекції.

Ключові слова: білок, ген, поліморфізм, рецептор, SNPs.

Постановка проблеми. Ступінь відкладення жиру в спинному салі визначається взаємодією багатьох факторів зовнішнього та внутрішнього середовищ. Однією з найважливіших передумов формування необхідного для селекційного процесу фенотипу є відповідні генетичні фактори, тобто певні алельні варіації, що визначають потенціал майбутнього організму.

Аналіз основних досліджень і публікацій, у яких започатковано розв'язання проблеми. За сучасних світових тенденцій свинарства актуальним стало створення чистопорідних і гібридних ліній із високим виходом пісного м'яса, зменшеною товщиною спинного сала та конверсії корму. Оптимізувати селекційний процес можна з використанням молекулярно-генетичних маркерів. Одним із таких маркерів, що впливає на товщину та інтенсивність росту спинного сала, є ген рецептора меланокортину-4 (*mc4r*).

Ген *mc4r* розташований на хромосомі 1 свині в ділянці q22–q27 [9]. Його алелі характеризуються домінантним успадкуванням та відсутністю іншої фенотипової патології крім надмірної осаленості.

Більшість досліджень виявили чітку кореляцію між різними алельними станами гену *mc4r* та харчовою поведінкою в різних породах свиней. Певні протиріччя виникали здебільшого при гетерозиготності експериментальних тварин [3], коли вирішальна роль цього гену у регуляції вживання їжі була під питанням. Іншим аспектом залишається недостатня вивченість впливу окремих алельних станів цього гену на форму-

вання спинного сала різних порід свиней [7], що спонукає до подальшого інтенсивного дослідження теми.

Однією з найбільш фундаментальних робіт, присвячених дослідженню впливу гену *mc4r* на харчову поведінку різних порід свиней, є праця C.S. Bruun із співавторами [5], у якій проаналізовано кореляцію між наявністю місенс-мутації гену та осаленістю, розмірами і харчовою поведінкою. Їх результати вказують на чітку різницю між впливом на фенотип різних алельних станів гену *mc4r* у досліджених порід свиней у межах 1,0 мм. Окрім того, дослідження Bruun C.S вказує на вірогідність існування певної породоспецифічності впливу цього гену на товщину спинного сала. Зокрема не виявлено чіткої кореляції між поліморфізмами гену *mc4r* та відкладенням підшкірного жиру у свиней великої білої (ВБ) породи [8] і нащадків від схрещення ВБ із дикою свинею [12]. Попри те, вітчизняні експерименти О.М. Коновал із колегами все ж таки наголошують на певному зв'язку між різними алельними станами цього гену та відгодівельними якостями свиней великої білої породи [1].

Іншим претендентом на роль генетичного маркера товщини спинного сала є ген *hmg1* (високомобільної групи білків A1), розташований на хромосомі 7 свині [11], що кодує протеїнові фактори, які регулюють транскрипцію деяких генів, змінюють структуру хроматину [14], відіграють головну роль у процесі клітинного розвитку та диференційовки [4], виконують свою головну фізіологічну функцію в ембріональному розвитку [6], в тому числі й жирової тканини.

Особливо актуальними є дослідження поєднаного впливу різних SNPs генів *hmg1* та *mc4r* на відгодівельні якості свиней великої білої породи. Наприклад, комбінований аналіз поєданого впливу різних алельних станів цих генів на жирову тканину при вивченні 470 свиней породи

* Керівник – кандидат біологічних наук К.Ф. Почерняєв

Дюрок із *Korea Swine Association* [10] показав, що їх SNPs корелюються з товщиною спинного сала, оскільки мали місце значні відмінності цього показника при поєднаннях різних генотипів. Автори дослідження дійшли висновку про доцільність використання обох поліморфізмів для маркерної селекції потрібних ознак у свинарстві.

Мета досліджень та методика їх проведення.

Первинним етапом маркерної селекції є виявлення наявності поліморфізму необхідного гену. Таким чином, метою роботи було виявлення поліморфізму генів *mc4r* та *hmgal*, що відповідають за формування м'ясних і відгодівельних ознак свиней великої білої породи племінних господарств Полтавської та Сумської областей. Для оцінки впливу селекції на зменшення товщини спинного сала була взята ДНК свиней 2002 року – 21 тварина з П/З «Комсомолець» Миколаївської області.

Для генетичного аналізу були відібрані 132 свині великої білої породи з наступних господарств: 14 тварин – із АФ «Степне» (забір біоматеріалу здійснювався у 2006 році) Запорізької області, 54 тварини – з АФ «Оржицька» Полтавської області (забір матеріалу проводився у 2008 році), 14 тварин – з АФ «Україна» Полтавської області (забір матеріалу у 2009 році), 4 тварини – з АФ «Родючість» та 25 тварин – з АФ «Низи» Сумської області (забір матеріалу у 2009 році). ДНК виділяли з крові або щетини шляхом очистки зразка від металовмісних сполук та протеїнів методом кип'ятіння з додаванням Chelex-100 [2]. Визначення алельних варіантів генів *mc4r* та *hmgal* проводили за допомогою ампліфікації ділянки гена з використанням технології полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та поліморфізму довжин рестриктних фрагментів (ПДРФ) за методикою, описаною *K.S. Kim* зі співавторами [10]. Електрофорез проводили у 1,5% агарозному гелі. Статистичну обробку отриманих результатів виконали з використанням комп'ютерної програми «GenAlEx 6» [13].

Результати досліджень. Аналіз одонуклеотидного поліморфізму гена *mc4r* G>A, що веде до заміни в амінокислотній послідовності *Asp298Asn*, визначив поліморфізм у свиней великої білої породи, який до того був описаний у породи дюрок [10]. Алель G (*Asp298*) характеризується рестриктними фрагментами розміром 150 та 70 пн., алель A (*Asn298*) – не піддається дії рестриктази й має молекулярну масу 220 пн. Фрагменти розміром 220, 150, 70 пн вказують на гетерозиготність тварин за цим геном. У ході

досліджень нами були виявлені генотипи AA, AG та GG.

По частотам алелей можна зазначити більш чіткий розподіл 3:1 між алелем A (~75%) та G (~25%), що спостерігалось в популяціях свиней ВБ з АФ «Оржицька», АФ «Україна», АФ «Степне» та в цілому по вибірці. Деяке відхилення від цього співвідношення мало місце у тварин з АФ «Низи» (A – 60% та G – 40%) та П/З «Комсомолець» (A – 83% та G – 17%). Враховуючи рік взяття біоматеріалу (2009 – для АФ «Низи» та 2002 – для П/З «Комсомолець») можна побачити очевидне зниження частоти алелю G, який корелює зі зменшенням рівня накопичення жиру. Цьому можна знайти два пояснення: 1) в АФ «Низи» були завезені кнури угорської селекції; 2) має місце селекція на зменшення товщини спинного сала.

Необхідним під час аналізу генетичної структури популяції є визначення індексу фіксації (*F*), що дозволяє встановити ступінь інбридингу. В разі значення *F* близького до нуля має місце випадкове спарювання (панміксія), в той час як додатний результат вказує на споріднене схрещування або наявність нуля алелей. Під нуль алелями розуміються алелі, які з будь-яких методичних причин неможливо ідентифікувати. Від'ємний показник спостерігається в разі надлишку гетерозиготності, через негативне асортативне схрещування (між не випадково підібраними партнерами), або селекцію на гетерозис.

Визначався індекс фіксації за формулою

$$F = (H_e - H_o) / H_e,$$

де: *H_e* – очікувана гетерозиготність, *H_o* – фактична гетерозиготність, підраховані з використанням програми «GenAlEx 6» [13].

Для більшості досліджених популяцій (АФ «Оржицька», П/З «Комсомолець» та АФ «Степне») було виявлено помірне значення коефіцієнту інбридингу (*F* від -0,333 до -0,200), що свідчить про гетерозиготність окремих особин, тоді як у популяції з АФ «Україна» (*F* 0,152) спостерігається підвищення ролі інбридингу, а в АФ «Низи» (*F* 0,000) наявна панміксія.

Аналіз розповсюдження різних генотипів гена *mc4r* показало домінування генотипу AA (54% – в АФ «Оржицька», 64% – в АФ «Україна», 67% – в П/З «Комсомолець», 53% – в цілому по вибірці). Проте у представників ВБ з АФ «Низи» домінує генотип AG – 48%, а з АФ «Степне» розподіл генотипів AA та AG – 50:50. Генотип GG зустрівся лише у тварин з АФ «Україна» (7%) та АФ «Низи» (16%), і значного впливу в формуванні гаплотипів не мав.

Оцінка достовірності розподілу генотипів гену *mc4r* за методом χ -квадрата, що показує відхилення фактичної гетерозиготності від очікуваної, показала достовірність за першим ступенем для популяції свиней з АФ «Оржицька»; в інших випадках такої достовірності не виявлено, що можна пояснити певним селекційним тиском.

Аналіз однонуклеотидного поліморфізму С>Т у нуклеотидній позиції 576 гену *HMGA1* визначив значно менший поліморфізм у свиней великої білої породи, ніж у породи дюрорк [10]. Аallel С характеризується рестриктними фрагментами розміром 580 та 120 пн., аallel Т, який за літературними даними відповідає меншому відкладенню хребтового сала, – має масу 700 пн. Фрагменти розміром 700, 580, 120 пн вказують на гетерозиготність тварин за цим геном. У ході досліджень нами були виявлені генотипи СС, СТ та ТТ.

Частота алелю Т, який у популяціях свиней породи дюрорк пов'язують зі зменшеною товщиною спинного сала, в різних вибірках коливалася від 0,102 до 0,036. Ймовірно, це пов'язано з тим, що в популяції свиней великої білої породи (на відміну від дюрорк) суттєвого впливу на м'ясні та відгодівельні якості алель Т гена *hmgal* не має. Відповідно, селекційний тиск на цей ген був мінімальним.

Для більшості досліджених за геном *hmgal* популяцій (АФ «Україна», АФ «Низи», П/З «Комсомолец» та АФ «Степне») було визначено помірне значення коефіцієнту інбридингу (*F* від -0,087 до -0,037), що свідчить про надлишок гетерозигот. Лише в популяції кнурів АФ «Оржицька» був зафіксований додатний показник генетичної міграції (*F*. 0,494), що свідчить на користь інбридингу.

При дослідженні генотипів гена *hmgal* стало очевидним значне домінування генотипу СС

(85% – в АФ «Оржицька», 86% – в АФ «Україна», 84% – в АФ «Низи», 86% – в П/З «Комсомолец», 93% – в АФ «Степне», 86% – у цілому по вибірці). Роль генотипу СТ значно нища – його відсоток склав не більше 16% (АФ «Низи»). Генотип ТТ зустрівся тільки тричі у представників з АФ «Оржицька», знявши у загальному підрахунку 2%, що пояснюється незначною поширеністю алелі Т у популяції свиней великої білої породи.

Оцінка достовірності розподілу генотипів гену *hmgal* за методом χ -квадрата показала достовірність за першим ступенем для популяції свиней з АФ «Оржицька» та третього, найвищого ступеню в цілому по популяціях. В інших випадках такої достовірності не виявлено, що можна пояснити певним селекційним тиском.

Стосовно розповсюдження різних гаплотипів, тобто поєднань алельних варіантів двох генів, у популяціях ВБ слід зазначити значне домінування двох варіантів: ААСС (46,2%) та АГСС (35%), які залишають на інші гаплотипи 18,8%. Гаплотипів GGCT та GGTT із-поміж досліджених тварин взагалі виявлено не було, що пояснюється рідкістю виявлення генотипів: GG та TT.

Висновки. На підставі проведених досліджень можна зробити наступні висновки:

1. У популяціях свиней великої породи з племінних господарств Полтавської та Сумської областей спостерігається поліморфізм генів *mc4r* та *hmgal*, що вказує на доцільність проведення наступного етапу досліджень для оцінки зв'язку цих SNPs із відгодівельними якостями.

2. Наявність різних гаплотипів підтверджує необхідність вивчення можливої взаємодії генів *mc4r* та *hmgal* у відкладенні жиру в спинному салі свиней.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Коновал О.М. Ген MC4R як генетичний маркер приросту жирової маси у свиней / Коновал О.М., Костенко С.О., Спиридонов В.Г. [та ін.] // Науковий вісник Ужгород. ун-ту (Серія: Біологія). – 2008. – Вип. 22. – С. 110-113.
2. Корінний С.М. Шерсть тварин як зручний об'єкт виділення ДНК для аналізу за допомогою ПЛР / Корінний С.М., Почерняєв К.Ф., Балацький В.М. // Ветеринарна біотехнологія: Бюл. ІВМ УААН. – 2005. – № 7. – С. 80-83.
3. Barb C.R., Robertson A.S., Barrett J.B., et al. The role of melanocortin-3 and -4 receptor in regulating appetite, energy homeostasis and neuroendocrine function in the pig // Journal of Endocrinology. – 2004. – Vol. 181. – P. 39-52.
4. Battista S., Fedele M., Hoyos J.M., et al. High-mobility-group A1 (HMGA1) proteins down-regulate the expression of the recombination activating gene 2 (RAG2) // Biochem. J. – 2005. – Vol. 389. – P. 91-97.
5. Bruun C.S., Jorgensen C.B., Nielsen V.H., et al. Evaluation of the porcine melanocortin 4 receptor (MC4R) gene as a positional candidate for a fatness QTL in a cross between Landrace and Hampshire // Animal Genetics. – 2006. – Vol. 37. – P. 359-362.
6. Chiappetta G., Avvantaggiato V., Visconti R., et al. High level expression of HMGI(Y) gene during embryonic development // Oncogene. – 1996. – Vol. 13. – P. 2439-2446.
7. Fan B., Onteru S.K., Plastow G.S. and Rothschild

- M.F.* Detailed characterization of the porcine MC4R gene in relation to fatness and growth // *Animal Genetics*. – Vol. 40. – 2009. – P. 401-409.
8. *Kim K.S., Larsen N., Short T., Plastow G. and Rothschild M.F.* A missense variant of the porcine melanocortin 4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits // *Mammalian Genome*. – 2000. – Vol. 11. – P. 131-135.
9. *Kim K.S., Larsen N.J. and Rothschild M.F.* Rapid communication: Linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene // *J. Anim. Sci.* – 2000. – Vol. 78. – P. 791-792.
10. *Kim K.S., Lee J.J., Shin H.Y., et al.* Association of melanocortin 4 receptor (MC4R) and high mobility group AT-hook 1 (HMGA1) polymorphisms with pig growth and fat deposition traits // *Animal Genetics*. – Vol. 37. – 2006. – P. 419-421.
11. *Kim K.S., Thomsen H., Bastiaansen J., et al.* Investigation of obesity candidate genes on porcine fat deposition quantitative trait loci regions. // *Obesity Research*. – 2004. – Vol. 12. – P. 1981-1994.
12. *Park H.B., Carlborg O., Marklund S. and Andersson L.* Melanocortin 4 receptor (MC4R) genotypes have no major effect on fatness in a Large White x Wild Boar intercross // *Animal Genetics*. – 2002. – Vol. 33. – P. 155-157.
13. *Peakall, R. and Smouse P.E.* GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – 6. – P. 288-295.
14. *Reeves R. and Nissen M.S.* The AT DNA binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal protein. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. // *J. Biol. Chem.* – 1990. – Vol. 265. – P. 8576-8582.