

УДК 577.21; 636.082

Поліморфна система периліпінового гену у селекційних програмах по покращенню відгодівельних якостей свиней

В. Ю. Нор, молодший науковий співробітник

Інститут свинарства і АПВ НААН України

О. І. Метлицька, доктор сільськогосподарських наук

Інститут розведення і генетики тварин НААН України

У технології ПЛР-ПДРФ проведений аналіз вибірок свиней миргородської та великої білої порід, оцінена їхня алельна варіабельність і породоспецифічний характер розподілу генотипів. За використання однофакторного дисперсійного аналізу встановлений вірогідний вплив генотипів за PLIN1 і PLIN2 поліморфним сайтам на показник товщини шпик у свиней миргородської та великої білої порід ($p \leq 0,001$), із силою впливу на формування досліджуваної ознаки відповідно 59,7% і 36,3%; 27,7% и 22,7%. Показані проблеми та перспективи використання PLIN генотипування в селекційних програмах поліпшення відгодівельних якостей свиней.

Ключові слова: поліморфізм, ген периліпіну, гетерозиготність, MAS, SNP.

Сучасні тенденції у розвитку галузі свинарства, орієнтовані на збільшення м'ясної продуктивності, скоростиглості та зниження конверсії кормів при збереженні рівня відтворюваності, є серйозною загрозою для існування місцевих порід, що не відповідають вимогам ринку, але характеризуються унікальними адаптаційними якостями і специфічністю генофонду. Однією з унікальних порід свиней України вважається миргородська, яка нині знаходиться на межі зникнення. Робота з малочисельними популяціями свиней методами класичної індексної селекції не запобігає негативним ефектам інбридингу, тому потребує використання додаткової надійної генетичної інформації про рівень мінливості і генетичної схожості особин, призначених

для репродукції. Вирішенням ситуації, що склалася, може стати впровадження маркер асоційованої селекції (MAS) [1] в програми з розведення миргородської породи. Явище генетичної гетерогенності для більшості кандидатних генів кількісних ознак призводить до необхідності окремого популяційного дослідження для кожної породи і розробки селекційних стратегій на основі результатів генетичного аналізу референтних стад з урахуванням характерних паратипових факторів.

Ідентифікація головних генів, які вносять найбільший вклад у загальну фенотипову варіансу і зумовлюють прояв ознаки, що селекціонується, з подальшим відбором тварин бажаного генотипу, є основою цього методичного підходу [2]. Однією з ключових ланок генної мережі, що контролює процеси депонування підшкірного жиру, є ген периліпіну (*PLIN*-маркер), однонуклеотидні поліморфізми (SNP) кодуючої області якого: *PLIN1* (4119 A>G стосовно карти гена) та *PLIN2* (7966 T>C), асоційовані з показником середньодобових приростів у свиней деяких порід [3].

У зв'язку з цим, **метою нашої роботи** було проведення генетико-популяційного аналізу свиней миргородської та великої білої порід за двома сайтами нуклеотидних замін гена периліпіну (*PLIN1* и *PLIN2*), а також пошук асоціацій між встановленими генотипами та відгодівельними якостями свиней (показником середньодобових приростів і товщиною шпику на рівні 6-7-го грудних хребців).

Матеріал і методика досліджень. Проводили популяційно-генетичний аналіз вибірки тварин миргородської породи (n=49), з ДП ДГ ПЗ ім. Декабристів. Як аутгрупи були взяті свині найрозповсюдженішої породи на території України – великої білої (n=46): АФ СВК «Оржицька», ДП ДГ «Степне», ПАФ «Україна», ТОВ «Маяк» Полтавської обл. Контрольну відгодівлю тварин від цих стад здійснювали в умовах спеціалізованої станції за виробничого породовипробовування у дослідному господарстві «Надія» Інституту свинарства і агропромислового виробництва НААН України, с. Тахтаулово Полтавської області. Визначення генотипів тварин методом ДНК

аналізу проводили в лабораторії генетики цієї науково-дослідної установи (м. Полтава).

Геномна ДНК свиней була екстрагована сольовим методом [4]. Аналіз поліморфізму досліджуваних локусів проводили шляхом ампліфікації ділянок геномної ДНК з таким їх рестриктним аналізом (ПЛР-ПДРФ) [5]. Рестрикцію продуктів ПЛР проводили за використання ендонуклеаз *HinII* і *NlaIV* відповідно до рекомендацій виробника. Візуалізацію електрофореграм проводили за допомогою транслюмінатора в УФ світлі. Виміри товщини шпику на рівні 6 – 7-го грудних хребців здійснювали прижиттєво за допомогою ультразвукового приладу PigLog 105 (SFK Technology, Данія), розрахунок середніх значень і статистичної помилки показників прижиттєвого виміру товщини шпику свиней на відгодівлі та їх середньодобових приростів залежно від генотипу – за двома поліморфними сайтами гена периліпіну (*PLIN1* і *PLIN2*)[6], однофакторний дисперсійний аналіз для визначення сили впливу *PLIN*-локусів на окремі відгодівельні якості свиней – з використанням стандартної комп'ютерної програми Microsoft Office Excel 2010.

Показник сили впливу конкретного локусу на кількісну ознаку розраховували за формулою: $D^2 = C_x / C_y$, де C_x – факторіальна дисперсія; C_y – загальна дисперсія [7].

Розрахунок генетико-популяційних параметрів проводили за допомогою програми GenAlex 6.0 [8].

Результати досліджень. Аналізуючи характер розподілу частот генотипів (табл.1) варто відзначити, що у експериментальній вибірці свиней великої білої породи виявлені достовірні відмінності від теоретично очікуваних розподілів згідно з законом Харді-Вайнберга за обома поліморфними сайтами гена периліпіну (*PLIN1*, $p \leq 0,001$; *PLIN2*, $p \leq 0,01$), тоді як для свиней миргородської породи така закономірність була показана лише для 7966 T>C поліморфізму *PLIN2* ($p \leq 0,001$).

Одним з основних показників, що відображають динаміку генетичної структури популяцій є гетерозиготність, а числовим виразом відхилення частот

гетерозиготних генотипів від теоретично очікуваного розподілу – індекс фіксації Райта (F_{is}), значення якого для відносно замкнених штучних популяцій (стад сільськогосподарських тварин) може бути розцінено як ступінь селекційного тиску і аналізу причин його виникнення.

1. Генетико-популяційна характеристика свиней за SNP сайтами *PLIN1*, *PLIN2*

Порода	Частоти					Гетерозиготність		Індекс фіксації Райта (F_{is})
	Генотипів (фактична/очікувана)			Алелів		Фактична (Ho)	Очікувана (He)	
	AA	AG	GG	A	G			
	<i>PLIN1</i>							
Миргородська	0,388/0,338	0,388/0,487	0,224/0,175	0,582	0,418	0,388	0,487	0,203
Велика біла	0,304/0,171	0,218/0,485	0,478/0,345***	0,413	0,587	0,217	0,485	0,552
	<i>PLIN2</i>							
	CC	CT	TT	C	T			
Миргородська	0,265/0,400	0,735/0,465*	0,000/0,135***	0,633	0,367	0,735	0,465	-0,581
Велика біла	0,478/0,384	0,283/0,471 ^a	0,239/0,145**	0,620	0,380	0,283	0,471	0,401

*** - $p \leq 0,001$, ** - $p \leq 0,01$, * - $p \leq 0,05$, критерій χ^2

Наявне у вибірках свиней великої білої породи за *PLIN1* і *PLIN2* та миргородської за *PLIN1* відхилення від очікуваного розподілу генотипів відбувається за рахунок переважання гомозигот, що вказує на існування інбредних особин і використання обмеженого числа плідників в експериментальних стадах, оскільки цілеспрямований добір тварин за цими маркерами не проводився. Не виключено, що встановлені популяційні особливості можуть вказувати на існування невідомих плейотропних ефектів гена периліпіну, який може бути маркером досліджуваних нами відгодівельних якостей свиней. Побічно про це може свідчити відсутність гомозиготних особин *TT* миргородської породи за сайтом *PLIN2* і статистично достовірне переважання фактичної кількості гетерозигот порівняно з розподілом *CT* генотипів у вибірці свиней великої білої породи ($p \leq 0,05$). Варто відзначити негативне значення фіксаційного коефіцієнта для миргородської породи за *PLIN2*, що відображає надлишкову кількість гетерозиготних особин та може бути пояснено аутбредним підбором батьківських пар або використанням генеалогічно неспоріднених плідників для цього стада.

За даними закордонних дослідників, встановлений вірогідний зв'язок генотипу AG за поліморфним сайтом 4119 A>G (*PLIN1*) із зниженою товщиною шпику у свиней порід ландрас і велика біла, генотипу AA – зі збільшеними середньодобовими приростами тварин; особини генотипу GG характеризуються небажаною осаленістю туш у результаті відгодівлі. Для генотипів, зумовлених інсерцією 7966 T>C (*PLIN2*) показано існування аналогічних асоціацій з окремими відгодівельними якостями свиней, при цьому особини СТ генотипу характеризуються зниженою товщиною шпику, а ТТ – високою інтенсивністю росту (середньодобові прирости) молодняку на відгодівлі.

Проведений нами популяційно-генетичний аналіз показав, що характер розподілу частот алелів по *PLIN1* був збалансованим з незначним переважанням у вибірці тварин миргородської породи алелю А (0,582) і алелю G (0,587) у особин великої білої породи. Для обох досліджених нами порід свиней, частота алелю С (0,633 і 0,620, відповідно) фрагмента гена *PLIN2* значною мірою переважала частоту альтернативного алеля Т (0,367 і 0,380), що може бути зумовлено його асоціацією з небажаною осаленістю туш та зниженими показниками середньодобових приростів молодняку на відгодівлі.

Для перевірки цієї робочої гіпотези про існування достовірного впливу окремих генотипів периліпінового локусу на формування ряду відгодівельних ознак свиней української селекції був застосований дисперсійний аналіз отриманих експериментальних результатів.

Встановлений вірогідний вплив генотипів за *PLIN1* і *PLIN2* поліморфними сайтами на показник товщини шпику у свиней миргородської та великої білої порід ($p \leq 0,001$) (табл.2). Сила впливу 4119 A>G і 7966 T>C генотипів на формування досліджуваної ознаки для свиней миргородської породи становала відповідно 59,7% і 36,3%. Для вибірки тварин великої білої породи показана вірогідна асоціація генотипів *PLIN1* і *PLIN2* з показником товщини шпику (для *PLIN1* - $p \leq 0,01$, для *PLIN2* - $p \leq 0,05$), а сила впливу становила відповідно 27,7% (4119 A>G) і 22,7% (7966 T>C).

Для жодної з досліджених порід статистично значимих закономірностей впливу генотипів *PLIN1* і *PLIN2* на середньодобовий приріст свиней з використанням методів варіаційної статистики виявити не вдалось. Не виключено, що відсутність такого зв'язку може бути пояснена не тільки породними особливостями тварин української селекції, а й недосконалою системою виміру середньодобових приростів в умовах контрольної відгодівлі, оскільки значення статистичної похибки було доволі вагомим. Так, для молодняку миргородської породи, значення статистичних похибок вимірювання середньодобових приростів тварин, диференційованих за *PLIN1* генотипами, коливалось в межах 24,97 - 41,55 г, а для великої білої 31,23-57,52 г.

Отже, в результаті проведених дослідів ми підтвердили значимість генетичної поліморфної системи гена периліпіну для селекції свиней, спрямованої на зменшення осаленості туш. При цьому, вплив досліджених SNP гена периліпіну на показник товщини шпику виявився статистично значущим і практично не залежав від породної приналежності.

Показники мінливості відгодівельних якостей свиней миргородської і великої білої породи стосовно різних генотипів за поліморфізмами гена периліпіну

Показники продуктивності	Миргородська порода			D ²
	<i>PLIN1</i>			
	AA	AG	GG	
	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	
Товщина шпику на рівні VI-VII грудних хребців, мм	33,05 ± 0,51	29,72 ± 1,13	36,36 ± 0,49***	0,597
Середньодобовий приріст, г	737,89 ± 24,97	743,06 ± 29,88	705,82 ± 41,55	0,015
	<i>PLIN2</i>			
	TT	CT	CC	
	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	
Товщина шпику на рівні VI-VII грудних хребців, мм	-	31,26 ± 0,69	36,08 ± 0,46***	0,363
Середньодобовий приріст, г	-	740,86 ± 20,31	709,92 ± 36,67	0,013

	Велика біла порода			
	<i>PLIN1</i>			D ²
	AA	AG	GG	
	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	
Товщина шпику на рівні VI-VII грудних хребців, мм	27,69± 2,44	26,14 ± 3,55	36,91± 1,74**	0,277
Середньодобовий приріст, г	740,43±44,48	900,00±57,52	848,11± 31,23	0,023
	<i>PLIN2</i>			
	TT	CT	CC	
	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	
Товщина шпику на рівні VI-VII грудних хребців, мм	27,04±3,19	27,75±2,77	36,48±1,81*	0,227
Середньодобовий приріст, г	722,64±45,85	872,92±56,58	851,25±31,08	0,126

*** - $p < 0,001$, ** - $p < 0,01$, * - $p < 0,05$.

Використання маркерної селекції за PLIN генотипами може дати не тільки відчутний комерційний ефект, але і сприяти збереженню зникаючих аборигенних порід, оскільки відкривається перспектива їхнього поліпшення на чистопорідній основі. Проведення подальших досліджень необхідно спрямувати на виключення негативних плейотропних ефектів селективно бажаних генотипів периліпінового локусу на фертильність племінних тварин і якість м'ясної продукції. Складність застосування MAS, заснованої на PLIN генотипуванні буде полягати і в необхідності створення заводських ліній, гомозиготних за альтернативними алелями для отримання гетерозиготних нащадків, що мають найбільше бажаних відгодівельних показників (мінімальна товщина шпику при високих середньодобових приростах).

Перспективи використання результатів молекулярно-генетичного маркування в селекційних програмах стикаються з рядом проблем, головною з яких варто назвати складність математичного прогнозування маркерних ефектів на результат добору за складними кількісними ознаками. Використання молекулярної інформації у свинарстві є перспективним напрямом, однак її широке впровадження потребує розробки всебічно інтегрованої стратегії, яка має бути нерозривно пов'язана з вирішенням поставлених комерційних задач.

Список літератури

1. Dekkers J. C. M. Commercial application of marker and gene assisted selection in livestock: Strategies and lessons / J.C.M. Dekkers // J. Anim. Sci. – 2004. – Vol. 82. – P. 313-328.
2. Marker assisted selection in German Holstein dairy cattle breeding: Outline of the program and marker-assisted breeding value estimation / J.N. Bennewitz, J. Reinsch, F. Szyda et al. [ed.Y. van der Honing] // Book of Abstr. 54th Annu. Mtg. Eur. Assoc. Anim. Prod., 2003. – P. 5 Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.
3. Vykoukalová Z. Porcine perilipin (PLIN) gene: Structure, polymorphism and association study in Large White pigs / Z. Vykoukalová, A.Knoll, S. Čepica // Czech J. Anim. Sci. – 2009. – Vol. 54, №8. – P.359–364.
4. Соколов Б. П. Выделение высокомолекулярной эукариотической ДНК с использованием ацетата калия / Б. П. Соколов, В. В. Джемелинский // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 1989. – № 6. – С. 45-46.
5. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia / R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. et al. // Science.- 1985. – V. 230. – P. 1350–1354.
6. Плохинский Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский. – М.: «Колос», 1969. – 368 с.
7. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.
8. Peacall R. GENALEX 6: genetic analisys in Excel Population genetic software and research/ R. Peacall, P.E. Smouse. //Molecula Ecology Notes. – 2006. – № 6. – P. 288-295.

ПОЛИМОРФНАЯ СИСТЕМА ПЕРИЛИПИНОВОГО ГЕНА В СЕЛЕКЦИОННЫХ ПРОГРАММАХ ПО УЛУЧШЕНИЮ ОТКОРМОЧНЫХ КАЧЕСТВ СВИНЕЙ

Виктор Нор, Елена Метлицкая

В технологии ПЦР-ПДФ произведен анализ выборок свиней миргородской и крупной белой породы, оценена их аллельная вариабельность и породоспецифический характер распределения генотипов. С использованием однофакторного дисперсионного анализа установлено достоверное влияние генотипов по *PLIN1* и *PLIN2* полиморфным сайтам на показатель толщины шпика у свиней миргородской и крупной белой пород ($p \leq 0,001$), с силой влияния на формирование исследуемого признака 59,7% и 36,3%; 27,7% и 22,7%, соответственно. Показаны проблемы и перспективы использования PLIN генотипирования в селекционных программах по улучшению откормочных качеств свиней.

Ключевые слова: полиморфизм, ген перилипина, гетерозиготность, MAS, SNP.

Polymorphic system of perilipin gene in breeding programs to improve the fattening qualities of pigs

V. Y. Nor, O. I. Metlytska

In PCR- RFLP technology they were analyzed samples of pigs of Mirgorod and Large White breeds, it was evaluated their allelic variability and breed specific nature of genotype distribution. In terms of using one-way analysis of variance it was established the possible impact of genotypes according to PLIN1 and PLIN2 polymorphic sites on the thickness of bacon of pigs of Mirgorod and Large White breeds ($p \leq 0.001$), with the power of the influence on the formation of the investigated characteristics 59.7 % and 36.3 %; 27.7 % and 22.7 %, respectively. There were demonstrated problems and prospects of PLIN genotyping use in breeding programs to improve the fattening qualities of pigs.

Key words: polymorphism, perilipin gene, heterozygosis, MAS, SNP.