

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНУ ЛЕПТИНУ В ПОПУЛЯЦІЯХ СВИНЕЙ ПОЛТАВСЬКОЇ М'ЯСНОЇ ТА МИРГОРОДСЬКОЇ ПОРОД

Є. К. Олійниченко, аспірант,
А. М. Саєнко, канд. с.-г. наук,
В. М. Балацький, канд. біол. наук

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН
вул. Шведська Могила, 1, м. Полтава, 36013, Україна

Представлені результати дослідження поліморфізму генетичних маркерів гену лептину (LEP) SNP g.3396 T>C і SNP g.2845 A>T в популяціях свиней порід полтавська м'ясна і миргородська. Генотипування тварин проводили методом ПЛР-ПДРФ, статистичний аналіз включав розрахунки частот алелів і генотипів, індекс поліморфного інформаційного змісту (PIC) і рівнів гетерозиготності фактичної та очікуваної. Встановлено, що в популяціях свиней досліджуваних порід LEP SNP g.3396 T>C і SNP g.2845 A>T характеризуються поліморфізмом. Рівень поліморфізму, оцінений за показниками гетерозиготності і PIC, достатній для проведення асоціативних досліджень для пошуку зв'язку маркерів з ознаками продуктивності свиней. Має місце відхилення фактичного розподілу генотипів від рівноважного за обома генетичними маркерами в миргородській породі і за SNP g.3396 T>C в полтавській м'ясній породі, що свідчить про селекційний тиск на LEP локус в популяціях цих порід. У перспективі досліджувани популяції свиней порід полтавська м'ясна і миргородська будуть використані для асоціативних досліджень з метою пошуку зв'язку маркерів з ознаками продуктивності свиней і впровадження маркер-асоційованої селекції.

Ключові слова: МАРКЕРНА СЕЛЕКЦІЯ, ПОЛІМОРФІЗМ, ГЕН ЛЕПТИНУ, ПОЛТАВСЬКА М'ЯСНА ПОРОДА СВИНЕЙ, МИРГОРОДСЬКА ПОРОДА СВИНЕЙ.

Однією із актуальних задач сучасного свинарства є розробка технологій отримання тварин з підвищеним вмістом м'яса в туші при збереженні високих якісних показників свинини, які відповідають потребам споживача. Її вирішення можливе лише при комплексному підході, одним із складових якого є ефективна маркер-асоційована селекція, направлена на поліпшення м'ясних кондицій і параметрів якості м'яса. Маркер-асоційована селекція передбачає оцінку тварин за допомогою молекулярно-генетичних маркерів, в основі яких - поліморфізм кандидатних генів локусів кількісних ознак (QTL, quantitative traits loci). До таких генів, зокрема тих, що впливають на м'ясні, відгодівельні якості свиней та якість м'яса належить і ген лептину (LEP). Продуктом експресії гена LEP є лептин – гормон з молекулярною масою 16 кДа, що циркулює у крові у вільній та зв'язаних формах. Лептин декретується, переважно, жировою тканиною і відіграє важливу роль в регуляції метаболізму, зокрема ліпідного обміну [1, 2], контролює споживання корму. Лептин, крім участі в ліпідному обміні, задіяний у регуляції імунної відповіді і контролі репродуктивної функції, впливає на зріст і формування кісткової тканини [3, 4]. Активність лептину регулюється через рецептори лептину, які належать до класу I суперсімейства цитокінових рецепторів.

Ген лептину свині локалізований у 18-й хромосомі, його довжина сягає майже 17 тис. пар нуклеотидів, складається з 3-х екзонів та 2-х нітронів [5]. Ключова роль лептинової регуляції ліпідного обміну на рівні організму дозволяє виявляти чіткі асоціації між різними алельними варіантами гену лептину та параметрами ліпідного обміну, пов'язаними з накопиченням жиру в підшкірній клітковині і між внутрішніми органами [6]. У цьому

контексті особливий інтерес представляють однонуклеотидні поліморфізми (SNP, single-nucleotide polymorphism) в гені лептину, які можуть бути використані, як генетичні маркери у маркер-асоційованій селекції свиней. В гені лептину свині виявлено низку однонуклеотидних поліморфізмів, локалізованих, як в його екзонних і інтронних ділянках, так і в прилеглих до гену 5'- та 3'- областях і регіонах, що не транлюються (UTR, untranslated regions). Визначення рівня поліморфізму SNP в породах свиней різного походження і напряму продуктивності є необхідним етапом при розробці ефективних ДНК маркерів для маркер-асоційованої селекції. Нашу увагу привернули SNP g.3396 T>C, який розташований у 3'UTR регіоні і SNP g.2845 A>T, локалізований у 2-му інтроні.

Мета роботи – на основі популяційного аналізу встановити рівень поліморфізму генетичних маркерів гену лептину SNP g.3396 T>C і SNP g.2845 A>T в субпопуляціях порід полтавська м'ясна і миргородська для оцінки можливості їх подальшого використання в асоціативних дослідженнях і маркер-асоційованій селекції.

Матеріали і методи. Об'єктом дослідження були субпопуляції свиней полтавської м'ясної (ПМ) породи (50 голів, племзавод «Біловодський» Луганської області) і миргородської (М) порід свиней (50 голів, племзавод ДП «ДГ «ім. Декабристів» Полтавської області).

ДНК із зразків крові тварин виділяли за допомогою реагенту Chelex 100 [7]. Типування тварин за локусом лептину по SNP g.3396 T>C і SNP g.2845 A>T проводили методом ПЛР-ПДРФ з урахуванням протоколів описаних в роботі [8]. Праймери для обраних SNP були підібрані з використанням програми FastPCR. Структура праймерів: LEP 3396F: AAC TCC AAG GCA CGA CAC, LEP 3396R: ACC CTG CTT GAT GGT CGA AAG GCT; LEP 2845F: TTG GCG AGC CTG GGA GCA GTC', LEP2845R:TCC CCA CTT AGG GAT GGA GGC TGC. Ампліфікацію проводили за температурним режимом 94 °C – 2 хв., 40 циклів – 94 °C – 30 с., 63 °C – 30 с., 72 °C – 40 с. Після проведення ампліфікації продукти були задіяні для рестриктного аналізу. Для SNP g.3396 T>C використовували рестриктазу *BglII* (Fermentas) для SNP g.2845 A>T використовували рестриктазу *XbaI* (Fermentas) згідно з інструкцією виробника. Електрофоретичне розділення продуктів рестрикції проводили в 6 % поліакриламідному гелі при напрузі електричного поля 110 В.

Статистичний аналіз. Частоти алелів і генотипів, індекс поліморфного інформаційного змісту (PIC - polymorphic information content) і рівні гетерозиготності H_o (гетерозиготність, що спостерігається) і H_e (очікувана гетерозиготність) були обчислені для кожної породи з використанням програмного забезпечення і методики, описаної GenALEX60 (9) і PIC калькулятора [10]. Достовірність відхилення фактичного розподілу генотипів від рівноважного, визначеного за формулою Гарді-Вайнберга, оцінювали за критерієм χ^2 .

Результати й обговорення. Результати генетико-популяційного аналізу щодо гену лептину по генетичних маркерах SNP g.3396 T>C і SNP g.2845 A>T полтавської м'ясної і миргородської порід свиней представлені в таблиці. В обох досліджених породах по кожному із зазначених генетичних маркерів виявлені обидва алелі гену LEP. Розподіл алелів по SNP g.3396 T>C в ПМ і М породах був майже однаковим. В досліджуваних субпопуляціях за частотою переважав алель g.3396 T. Подібна ситуація спостерігалася і у відношенні SNP g.2845 A>T, частоти алелів за даним генетичним маркером теж були практично однаковими при переважанні алеля g.2845 A. Але, за розподілом генотипів ПМ і М порід дещо відрізнялися. Так, за SNP g.3396 T>C в миргородській породі частота гетерозиготного генотипу (яка відповідала рівню гетерозиготності H_o) була вищою за частоту цього генотипу в субпопуляції полтавської м'ясної породи (0,70 і 0,59, відповідно). В ПМ породі виявлені гомозиготні тварини (g.3396 TT), тоді як в миргородській породі такі особини були відсутні. За генетичним маркером SNP g.2845 A>T, також, мали місце певні відмінності між породами щодо частот гетерозиготних генотипів.

Необхідно відзначити статистично значущі відхилення фактичного розподілу генотипів від рівноважного за обома генетичними маркерами в миргородській породі. По SNP

g.3396 T>C спостерігається брак гомозигот і суттєвий надлишок гетерозигот ($\chi^2 = 9,441$), по SNP g.2845 A>T, навпаки, має місце брак гетерозиготних генотипів ($\chi^2 = 10,653$). Очевидно, що в миргородській породі існує певний селекційний тиск на LEP локус, пов'язаний з відбором тварин з тими продуктивними ознаками, в контролі яких бере участь ген лептину. У той же час в полтавській м'ясній породі статистично підтверджено відхилення LEP генотипів лише за генетичним маркером SNP g.3396 T>C, що, також, може бути пов'язано з певним селекційним тиском на LEP локус в популяції ПМ породи. Значення індексу фіксації відповідають встановленому розподілу генотипів, фактичному і теоретично очікуваному. Для обох порід за генетичним маркером SNP g.3396 T>C він має від'ємне значення, що свідчить про певний аутбредний стан цих субпопуляцій за LEP локусом. У той же час за іншим SNP значення фіксаційного індексу свідчать про наявність певного рівня інбридингу. Ця, на перший погляд, парадоксальна ситуація може бути пояснена тим, що SNP g.3396 T>C і SNP g.2845 A>T, можливо, функціонально по-різному асоційовані з ознаками, які контролює ген LEP. Крім того, можна припустити, що між цими SNP відсутня нерівновага по зчепленню.

Таблиця

Розподіл частот алелів та генотипів за геном лептину в полтавській м'ясній і миргородській породах та типах свиней

Породи	SNP	Частоти алелів	Частоти генотипів			χ^2	F	PIC
			CC ¹ AA ²	CT ¹ AT ²	TT			
Полтавська м'ясна	LEP g.3396 T>C	C=0,32	0,03	0,59	0,38	4,886*	-0,354	0,34
		T=0,68	(0,10)	(0,44)	(0,46)			
Миргородська		C=0,35	0,00	0,70	0,30	9,441**	-0,535	0,35
		T=0,65	(0,12)	(0,45)	(0,42)			
Полтавська м'ясна	LEP g.2845 A>T	A=0,66	0,48	0,36	0,16	2,001	0,239	0,35
		T=0,34	(0,43)	(0,45)	(0,12)			
Миргородська		A=0,64	0,56	0,16	0,28	10,653**	0,653	0,35
		T=0,36	(0,41)	(0,46)	(0,13)			

Примітка: ¹ – генотип за SNP g.3396 T>C; ² – генотип за SNP g.2845 A>T; у дужках представлені очікувані частоти генотипів, розраховані за формулою Харді-Вайнберга. Частота гетерозиготного генотипу відповідає H_o , очікувана частота гетерозиготного генотипу відповідає H_e . Значення χ^2 використовується для оцінки достовірності відхилення фактичного розподілу генотипів від очікуваного.

Розраховано індекс поліморфного інформаційного змісту PIC (Polymorphism Information Content) генетичних маркерів LEP SNP g.3396 T>C і LEP SNP g.2845 A>T за величиною якого оцінено їх рівень поліморфізму для асоціативних досліджень. Оптимальні показники PIC, які забезпечують необхідне різноманіття генотипів для встановлення їх зв'язків з показниками продуктивності, знаходяться у межах від 0,25 до 0,75. В обох проаналізованих породах по обох генетичних маркерах рівень PIC має оптимальне значення (0,34–0,35) (табл).

ВИСНОВКИ

1. Генетичні маркери гену лептину (SNP g.3396 T>C і SNP g.2845 A>T) характеризуються поліморфізмом в популяціях свиней полтавської м'ясної і миргородської порід.

2. Рівень поліморфізму генетичних маркерів гену лептину SNP g.3396 T>C і SNP g.2845 A>T, оцінений за показниками гетерозиготності і показником інформаційного змісту (PIC = 0,34-0,35) достатній для проведення асоціативних досліджень для пошуку зв'язків маркерів з ознаками продуктивності свиней.

3. Має місце відхилення фактичного розподілу генотипів від рівноважного за обома генетичними маркерами в миргородській породі і за SNP g.3396 T>C в полтавській м'ясній породі, що свідчить про селекційний тиск на LEP локус в популяціях цих порід.

Перспективи досліджень. Досліджувані популяції свиней порід полтавська м'ясна і миргородська будуть використані для асоціативних досліджень з метою пошуку зв'язку маркерів з ознаками продуктивності свиней і впровадження маркер-асоційованої селекції.

LEPTIN GENE POLYMORPHISM IN THE POPULATIONS OF POLTAVA MEAT BREED OF PIGS, MYRHOROD BREED OF PIGS

Y. Oliinychenko, A. Saenko, V. Balatsky

Institute of Pig Breeding and Agro-Industrial Production of NAAS
1, Shvedska Mogila str., Poltava, 36013, Ukraine

S U M M A R Y

The results of the study of polymorphisms of genetic markers in leptin gene (LEP) SNP g.3396 T>C and SNP g.2845 A>T in populations of pigs of Poltava meat breed and Myrhorod breed are represented. Animal genotyping was performed by PCR-RFLP, statistical analysis included the calculation of frequencies of alleles and genotypes and index polymorphic information content (PIC) and levels of heterozygosity H_o and H_e . It was established LEP SNP g.3396 T>C and SNP g.2845 A>T to be polymorphic in populations of studied pigs. The level of polymorphism, evaluated in terms of heterozygosity and PIC, it is enough to set further researches to find connection of chosen markers with meat features. There is a deviation of the actual distribution of genotypes of equilibrium on both genetic markers in Myrhorod breed and the SNP g.3396 T>C in POLTAVA meat breed, indicating a selective pressure on the LEP locus in populations of these breeds. In the longer term of study populations of pig breeds of Poltava breed and Myrhorod can be used for associative studies to find connection of chosen markers with meat features and to use them in marker-associated selection.

Keywords: MARKER SELECTION, POLYMORPHISM, GENE OF LEPTIN, POLTAVA MEAT BREED OF PIGS, MYRHOROD BREED OF PIGS.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЛЕПТИНА В ПОПУЛЯЦИЯХ СВИНЕЙ ПОЛТАВСКОЙ МЯСНОЙ И МОРГОРОДСКОЙ ПОРОДАХ

Е. К. Олейниченко, А. М. Саенко, В. Н. Балацкий

Институт свиноводства и агропромышленного производства НААН
ул. Шведская Могила, 1, г. Полтава, 36013, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

Представлены результаты исследования полиморфизма генетических маркеров гена лептина (LEP) SNP g.3396 T>C и SNP g.2845 A>T в популяциях свиней пород полтавская мясная и миргородская. Генотипирование животных проводилось методом ПЦР-ПДРФ, статистический анализ включал расчеты частот аллелей и генотипов, индекс полиморфного информационного содержания (PIC) и уровней фактической и ожидаемой гетерозиготности. Установлено, что в популяциях свиней исследуемых пород LEP SNP g.3396 T>C и SNP g.2845 A>T характеризуются полиморфизмом. Уровень полиморфизма, оцененный по показателям гетерозиготности и PIC, является достаточным для проведения ассоциативных исследований для поиска связи маркеров с признаками продуктивности свиней. Имеет место отклонение фактического распределения генотипов от равновесного по обоим генетическими маркерами в миргородской породе и по SNP g.3396 T>C в полтавской мясной породе, что свидетельствует

о селекционном давлении на LEP локус в популяциях этих пород. В перспективе исследуемые популяции свиней пород полтавская мясная и миргородская будут использованы для ассоциативных исследований с целью поиска связи маркеров с признаками продуктивности свиней и внедрения маркер-ассоциированной селекции.

Ключевые слова: МАРКЕРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ, ПОЛИМОРФИЗМ, ГЕН ЛЕПТИНА, ПОЛТАВСКАЯ МЯСНАЯ ПОРОДА СВИНЕЙ, МИРГОРОДСКАЯ ПОРОДА СВИНЕЙ.

ЛІТЕРАТУРА

1. Коваренко М. А. Лептин: физиологические и патологические аспекты действия / М. А. Коваренко, Л. А. Руюткина, М. С. Петрищева, О. В. Бодавели // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина : сб. науч. работ. – 2003. – № 13. – С. 59–74. – Библиогр.: 1 назв.

2. Крылов М. Ю. Полиморфизм a19g гена лептина и полиморфизмы gln223arg и lys109arg гена рецептора лептина при постменопаузальном остеопорозе / М. Ю. Крылов, Л. И. Беневоленская, В. А. Мякоткин // РАМН, Москва: «Научно-практическая ревматология». – 2010. – № 5. – С. 27–31. – Библиогр.: 2 назв.

3. Zhang Y. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue / Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei // Nature. – 1994. – Vol 372. – P. 425–32. . – Библиогр.: 3 назв.

4. Pasco J. A. Serum leptin levels are associated with bone mass in no obese women / J. A. Pasco, M. J. Henry, M. A. Kotowicz // J. Clin Endocrinol Metab. – 2001. – Vol 86. – P. 1884–7. Библиогр.: 4 назв.

5. Ensemble database Technology [Electronic resource]. Access mode: http://www.ensembl.org/Sus_scrofa/Gene/Summary?g=ENSSSCG00000016588;r=18:21201786-21204671;t=ENSSSCT00000018060 (last access: 10.10.16). – Title from the screen. Библиогр.: 5 назв.

6. Панков Ю. А. Лептин в регуляции нейроэндокринной системы / Ю. А. Панков // III Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные проблемы нейроэндокринологии». – 2003. – С. 27–40. Библиогр.: 6 назв.

7. Walsh P. S. Chelex 100 as a Medium for Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material / P. S. Walsh, D. A. Metzger, R. Higuchi // BioTechniques. – 1991. – Vol 10. – P. 506-509. Библиогр.: 7 назв.

8. Kennes Y. M Characterization of swine leptin (LEP) polymorphisms and their association with production traits / Y. M. Kennes, B. D. Murphy, M. F. Palin // Animal Genetics. – 2001. – Vol. 32. – P. 215–218.

9. Peakall R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall and P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 288–295.

10. PIC calculator, [Electronic resource]. Access mode: <http://www.liv.ac.uk/~kempsj/pic.html> (last access: 06.11.16). – Title from the screen. Библиогр.: 10 назв.

Рецензент – С. М. Корінний, к. с.-г. н., с. н. с., Інститут свинарства і АПВ НААН.